



Universidad de Sevilla  
Departamento de Microbiología

## **TESIS DOCTORAL**

El efecto biofumigante de especies de la  
familia *Brassicaceae* en hongos fitopatógenos

**2019**

Autor:

*Julia Picón Toro*

Directores:

*Miguel Ángel Caviedes Formento*

*María del Carmen Morales Rodríguez*

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigación Agraria Finca La Orden-Valdesequera (Guadajira, Badajoz), perteneciente al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX).

***A mis padres***

***“La tierra es suficiente para todos  
pero no para la voracidad de los  
consumidores”.***

***Mahatma Gandhi***





Después de tantos obstáculos en el camino para realizar esta tesis, aún no me creo que es el momento de escribir los agradecimientos.

Este capítulo de mi vida empezó cuando me dieron una beca de formación de tecnólogos en la Finca La Orden-Valdesequera en 2006, desde entonces hasta hoy han pasado unos cuantos años llenos de adversidades e incertidumbres. No obstante, gracias al esfuerzo y a la ayuda recibida de forma desinteresada por parte de muchas personas, el final de este capítulo se aproxima.

Antes de poner punto y final quiero agradecer a todos aquellos que han colaborado directamente e indirectamente en la realización de esta tesis.

Al Departamento de Cultivos Extensivos que me acogió a mi llegada al centro y me ayudó en el desempeño de las diferentes labores para la puesta en marcha y desarrollo de los ensayos de campo. Gracias a todo el personal técnico y de campo (Adri, Teo y especialmente a Juani, estés donde estés siempre te recordaré) por vuestra ayuda y apoyo.

Al Departamento de Fitopatología, que me brindó la oportunidad de realizar la tesis, además de especializarme en el campo de los hongos de suelo. Carmen, Carolina y Eloy gracias por vuestra acogida y paciencia para enseñarme todas las técnicas de análisis de hongos y por ayudarme a realizar todos los ensayos que forman parte de esta tesis. No me puedo quedar atrás a Ángela, mi becaria, sin ella no podría haber realizado mis ensayos de 400 placas. Gracias por estar ahí, por ayudarme siempre, por tus consejos y por compartir esa cajita en los tiempos adversos, que no fueron pocos...El que fuéramos unas "pringuis" no nos impidió que disfrutásemos día a día en el trabajo, estábamos acostumbradas, siempre había algo que podía ocurrir (inundaciones, pulgones, contaminaciones...).

A Benito, por darle prioridad a mis ensayos de campo; al equipo de malas hierbas, gracias Loli por estar siempre ahí; a Mónica, por tu apoyo y por compartir los instrumentos de medida de las propiedades del suelo; a las chicas de forestales (M<sup>a</sup> José y María) por poner un poco de alegría en el pasillo...

A los que llegaron más tarde a este capítulo, Ramón y Charo, muchísimas gracias por acogerme como si me conocieseis de toda la vida. A ti, Miguel Ángel, que sin conocerme y de forma desinteresada te ofreciste a continuar y a terminar esta tesis, muchas gracias, sin ti (usted) esta tesis nunca hubiese finalizado, simplemente los datos hubieran quedado en el cajón.

A Carmen, la otra parte esencial y clave en la finalización de la tesis, gracias por tu paciencia en la corrección, releer y releer. Alguien tenía que poner orden a todos esos datos!! Gracias.

A mi familia, a mis padres, por siempre estar ahí y animarme en todo momento a continuar con esta tesis, y especialmente a mi hermana, por insistir e insistir que había que acabar la tesis.

A mis amigas, por su compañía y apoyo en los momentos difíciles.

A mis compañeros de departamento del IES de Llerena, especialmente a Lola y Antonio, por darme siempre prioridad en todo, enseñarme, ayudarme y, por supuesto, compartir esos momentos de puesta en común.

A Marcelo, el último en llegar a este capítulo de mi vida, hacemos un gran equipo. Gracias por hacerme las cosas tan fáciles, por tu paciencia y entender todas mis "ocupaciones". Gracias





<b>Índice .....</b>	<b>9</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>15</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>17</b>
 <b>Capítulo 1: Introducción general .....</b>	 <b>19</b>
1.1.    Introducción .....	21
1.1.1. Técnicas de control de hongos fitopatógenos.....	21
1.1.1.1. Biofumigación .....	22
1.1.1.2. Solarización .....	28
1.1.1.3. Biosolarización .....	30
1.1.2. El suelo .....	31
1.1.2.1. Efecto de las técnicas de control de patógenos en las propiedades del suelo.....	34
1.1.3. La tristeza del pimiento y la fusariosis vascular del tabaco: dos enfermedades causadas por hongos fitopatógenos del suelo .....	37
1.1.3.1. La tristeza del pimiento .....	39
1.1.3.1.1. El cultivo de pimiento para pimentón.....	40
1.1.3.1.2. Síntomas de la enfermedad de la tristeza y agente causal .....	43
1.1.3.1.2.1. Género <i>Phytophthora</i> de Bary.....	45
1.1.3.1.2.1.1. <i>Phytophthora nicotianae</i> Breda de Haan.....	49
1.1.3.2. La fusariosis vascular del tabaco.....	51
1.1.3.2.1. El cultivo de tabaco en Extremadura .....	51
1.1.3.2.2. Síntomas de la fusariosis vascular y agente causal.....	54
1.1.3.2.2.1. Género <i>Fusarium</i> Link.....	56
1.1.3.2.2.1.1. <i>Fusarium oxysporum</i> (Schlecht.) Snyder y Hans .....	58
1.2.    Objetivo general .....	59
 <b>Capítulo 2: Evaluación en condiciones de laboratorio de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización para el control de <i>Phytophthora nicotianae</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....</b>	 <b>65</b>
2.1.    Introducción .....	63
2.2.    Objetivo .....	64
2.3.    Inhibición del crecimiento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	64
2.3.1. Efecto de la especie de <i>Brassicaceae</i> y parte de la planta empleada como biofumigante.....	65
2.3.1.1. Material y métodos .....	65
2.3.1.1.1. Material biofumigante.....	65
2.3.1.1.2. Material fúngico.....	66
2.3.1.1.3. Medida de la inhibición del crecimiento micelial .....	67
2.3.1.2. Análisis estadístico.....	68
2.3.1.3. Resultados .....	69
2.3.1.3.1. Efecto de la especie de <i>Brassicaceae</i> (parte aérea) en la inhibición del crecimiento micelial.....	69

2.3.1.3.2.	Efecto de la parte de la planta empleada y de la especie de <i>Brassicaceae</i> en la inhibición del crecimiento micelar .....	70
2.3.1.4.	Discusión .....	76
2.3.2.	Pellets de <i>Brassica carinata</i> (BioFence®) y torta de colza como materiales biofumigantes .....	82
2.3.2.1.	Material y métodos .....	83
2.3.2.1.1.	Material biofumigante.....	83
	A. Pellets de <i>B. carinata</i> .....	83
	B. Torta de colza .....	84
2.3.2.1.2.	Material fúngico.....	84
2.3.2.2.	Resultados .....	84
2.3.2.2.1.	Efecto de los pellets de <i>B. carinata</i> en la inhibición del crecimiento micelar .....	84
2.3.2.2.2.	Efecto de la torta de colza en la inhibición del crecimiento micelar .....	86
2.3.2.3.	Discusión.....	88
2.4.	Inactivación del inóculo de <i>Phytophthora nicotianae</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	92
2.4.1.	Material y métodos .....	92
2.4.1.1.	Preparación y cuantificación del inóculo .....	93
2.4.1.1.1.	Inóculo de <i>Phytophthora nicotianae</i> .....	93
	A. Triturado micelar .....	94
	B. Clamidosporas.....	94
2.4.1.1.2.	Cuantificación del inóculo de <i>P. nicotianae</i> .....	95
2.4.1.1.3.	Inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	95
2.4.1.1.4.	Cuantificación del inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	96
2.4.2.	Análisis estadístico.....	97
2.4.3.	Efecto de las especies de <i>Brassicaceae</i> , pellets de <i>B. carinata</i> y de la temperatura constante y fluctuante .....	97
A.	Efecto en condiciones de temperatura constante con especies de <i>Brassicaceae</i> .....	98
A.1.	Resultados .....	98
A.2.	Discusión .....	102
B.	Ensayo en condiciones de temperatura fluctuante con especies de <i>Brassicaceae</i> . Condiciones de biosolarización y biofumigación en Murcia y Extremadura .....	103
B.1.	Resultados .....	105
B.2.	Discusión .....	107
C.	Ensayo en condiciones de temperatura constante con pellets de <i>B. carinata</i> a diferentes tiempos de exposición .....	110
C.1.	Resultados .....	110
	a. Efecto de la temperatura constante y de los pellets de <i>B. carinata</i> en la inactivación del inóculo de <i>P. nicotianae</i> y <i>F. oxysporum</i> a diferentes tiempos de exposición .....	111

b. Efecto de la temperatura constante en la supervivencia del inóculo en los testigos de <i>P. nicotianae</i> y <i>F. oxysporum</i> a diferentes tiempos de exposición .....	116
1. Inóculo-talco de <i>F. oxysporum</i> .....	116
2. Triturado miceliar de <i>P. nicotianae</i> .....	118
3. Clamidosporas de <i>P. nicotianae</i> .....	120
C.2. Discusión .....	121
<b>Capítulo 3: Evaluación en condiciones de campo de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización para el control de <i>Phytophthora nicotianae</i> .....</b>	<b>127</b>
3.1. Introducción .....	129
3.2. Objetivo .....	130
3.3. Finca experimental .....	131
3.4. Material y métodos .....	132
3.4.1. Diseño experimental .....	132
3.4.2. Supervivencia e infectividad de <i>Phytophthora nicotianae</i> .....	138
3.4.2.1. Producción de inóculo .....	138
3.4.2.2. Supervivencia e infectividad del inóculo .....	138
3.4.3. Temperatura y humedad .....	140
3.4.4. Análisis de los datos .....	141
3.5. Campañas .....	142
A. Campaña 2008-2009 .....	142
A.1. Resultados .....	146
I. Supervivencia e infectividad .....	146
II. Temperatura .....	147
A.2. Discusión .....	149
B. Campaña 2009-2010 .....	151
B.1. Resultados .....	154
I. Supervivencia e infectividad .....	154
II. Temperatura .....	154
III. Humedad .....	155
B.2. Discusión .....	156
C. Campaña 2010-2011 .....	157
C.1. Resultados .....	161
I. Supervivencia e infectividad .....	161
II. Temperatura .....	162
III. Humedad .....	164
C.2. Discusión .....	164
D. Campaña 2011-2012 .....	166
D.1. Resultados .....	169
I. Supervivencia e infectividad .....	169
II. Temperatura .....	170
III. Humedad .....	171
D.2. Discusión .....	172

3.6.	Efecto de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización en las propiedades físico-químicas del suelo y productividad.....	176
3.6.1.	Propiedades físicas del suelo .....	177
3.6.1.1.	Material y métodos .....	177
3.6.1.1.1.	Densidad aparente .....	178
3.6.1.1.2.	Resistencia a la penetrabilidad.....	179
3.6.1.2.	Análisis de los datos .....	179
3.6.1.3.	Campañas.....	180
A.	Campaña 2008-2009 .....	180
A.1.	Resultados.....	180
I.	Densidad aparente .....	180
II.	Resistencia a la penetrabilidad .....	181
A.2.	Discusión.....	181
B.	Campaña 2009-2010 .....	182
B.1.	Resultados.....	182
I.	Densidad aparente .....	182
II.	Resistencia a la penetrabilidad .....	183
B.2.	Discusión.....	184
C.	Campaña 2010-2011 .....	185
C.1.	Resultados .....	185
I.	Densidad aparente .....	185
II.	Resistencia a la penetrabilidad .....	185
C.2.	Discusión .....	186
D.	Campaña 2011-2012 .....	187
D.1.	Resultados .....	187
I.	Densidad aparente .....	187
II.	Resistencia a la penetrabilidad .....	189
D.2.	Discusión .....	191
3.6.2.	Propiedades químicas del suelo .....	193
3.6.2.1.	Material y métodos .....	193
3.6.2.2.	Análisis de los datos .....	194
3.6.2.3.	Campañas.....	194
A.	Campaña 2008-2009 .....	194
A.1.	Resultados .....	194
B.	Campaña 2009-2010 .....	197
B.1.	Resultados .....	197
C.	Campaña 2010-2011 .....	199
C.1.	Resultados .....	199
D.	Campaña 2011-2012 .....	203
D.1.	Resultados .....	203
E.	Evolución de los parámetros químicos .....	205
F.	Discusión.....	210
3.6.3.	Producción de pimiento .....	216
3.6.3.1.	Material y métodos .....	216
3.6.3.2.	Análisis de los datos .....	217
3.6.3.3.	Campañas.....	217
A.	Campaña 2008-2009.....	217
A.1.	Resultados .....	217
B.	Campaña 2009-2010.....	218



B.1. Resultados .....	218
C. Campaña 2010-2011.....	220
C.1. Resultados .....	220
D. Campaña 2011-2012.....	221
D.1. Resultados .....	221
E. Evolución de la producción de pimiento .....	222
F. Discusión .....	223
3.7. Efecto de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización en la microbiota fúngica del suelo.....	226
3.7.1. Material y métodos .....	227
3.7.1.1. Muestreo .....	228
3.7.1.2. Métodos de análisis.....	228
3.7.1.2.1. Análisis de la microbiota fúngica total.....	228
3.7.1.2.2. Análisis de la microbiota fusárica .....	229
3.7.2. Análisis de los datos.....	230
3.7.3. Resultados y discusión .....	231
3.7.3.1. Análisis de la microbiota fúngica total.....	231
3.7.3.2. Análisis de la microbiota fusárica .....	244
<b>Capítulo 4: Discusión general .....</b>	<b>253</b>
<b>Capítulo 5: Conclusiones.....</b>	<b>267</b>
<b>Capítulo 6: Referencias bibliográficas.....</b>	<b>273</b>



La intensificación de la actividad agrícola ha favorecido, por una parte, la pérdida de materia orgánica relacionada directamente con la fertilidad natural de los suelos, y por otra parte, la proliferación de organismos patógenos causantes de enfermedades en los cultivos. La prohibición actual de numerosos agroquímicos ha desencadenado la búsqueda de técnicas viables y sostenibles para el control de hongos fitopatógenos, responsables de cuantiosas pérdidas de producción de cultivos.

En esta memoria de tesis se estudió el efecto de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización en el control de las especies fúngicas *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, causantes de las enfermedades de la tristeza del pimiento y fusariosis vascular del tabaco en la Comunidad Autónoma de Extremadura. Esta memoria se divide en dos bloques:

- En el primero se describen los ensayos realizados en condiciones de laboratorio para poner a punto las técnicas y evaluar diferentes aspectos relacionados con la toxicidad de las especies biofumigantes, la sensibilidad de los hongos, la temperatura y tiempos de exposición. Entre los resultados destaca la toxicidad de los pellets de *B. carinata* frente al resto de materiales ensayados, la mayor susceptibilidad del micelio de *P. nicotianae* y el efecto de la temperatura, sola o combinada con especies biofumigantes, en la inactivación del inóculo de ambas especies fúngicas.

- En el segundo bloque, se detallan las técnicas aplicadas en condiciones de campo durante los meses de marzo-abril para el control de *P. nicotianae*. Los resultados mostraron que estas técnicas no son eficaces para el control de la tristeza de pimiento en Extremadura durante la primavera. Las bajas temperaturas constituyen el principal factor limitante de la eficacia de estas técnicas. Cabe señalar, que aunque estas técnicas no fueron viables en las condiciones ensayadas, la aplicación reiterada de tratamientos ha modificado las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo. Asimismo, se ha observado un incremento de la producción de pimiento para pimentón, consecuencia de las mejoras de las propiedades del suelo.



The intensification of agricultural activity has provoked, on the one hand, the loss of organic matter which is directly related with natural soil fertility, on the other hand, the proliferation of pathogen organisms that cause diseases in crops. The current prohibition of many agrochemicals products has led to search for viable and sustainable techniques for the control of phytopathogenic fungi, responsible for numerous losses of crops yield.

In this memory of thesis it was studied the effects of biofumigation, biosolarisation and solarisation techniques on the control of fungal species *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, which cause the pepper “tristeza” disease and Fusarium wilt of tobacco in the region of Extremadura. This memory is divided into two blocks.

In the first block it is described the different tests carried out under controlled conditions in order to adjust the techniques and assess different factors related to the toxicity of biofumigant species, the susceptibility of fungal species, the temperature and exposure times. Among the results, it highlights the toxicity of *B. carinata* pellets compared to the rest of tested materials, the major susceptibility of *P. nicotianae*’s mycelium and the effect of the temperature, alone or combined with biofumigant species, on the inoculum inactivation of both fungal species.

In the second block are detailed the applied techniques under field conditions during the months of March-April for the control of *P. nicotianae*. The results showed that these techniques are not effective to control the pepper “tristeza” disease in Extremadura in spring. It should be noted that although these techniques were not feasible under the conditions tested, the repeated application of treatments has changed the physical, chemical and biological properties of the soil. However, an increase in pepper for paprika production has been observed as a result of improvements in soil properties.



# Capítulo 1



## Introducción general





## 1.1. Introducción

### 1.1.1. Técnicas de control de hongos fitopatógenos

Uno de los mayores impactos de la agricultura reside en la aplicación masiva de agroquímicos y maquinaria agraria pesada, que constituyen los logros más destacados de la “Revolución Agraria” iniciada en el siglo XIX, aprovechando las ventajas del rápido desarrollo de los conocimientos de la química y de la mecánica. Al mismo tiempo, se olvida paulatinamente el conocimiento campesino, resultado de diez mil años de cultura agraria, que ha permitido el desarrollo de una agricultura adaptada a las características ecológicas de cada región, comarca o localidad (Bello *et al.*, 2008).

En este escenario es necesario introducir nuevos planteamientos para producir alimentos de calidad de forma sostenible, aplicando los últimos avances científicos y tecnológicos en el sector agrario y que protejan la integridad de los recursos naturales, asegurando la interacción equilibrada de los seres humanos, el agrosistema y el ambiente (Altieri, 1997; Ibáñez *et al.*, 2005; Bello *et al.*, 2008).

En agricultura, uno de los factores clave en la producción de cultivos es la proliferación de organismos patógenos del suelo, responsables de la aparición de plagas y enfermedades. A nivel mundial, este problema se ha resuelto, durante muchos años, mediante la aplicación de fumigantes del suelo como el bromuro de metilo (Bell *et al.*, 1996; Katan, 2005; Bello *et al.*, 2008). Desde el descubrimiento de su efectividad contra patógenos de origen edáfico allá por la década de los años 30 del siglo pasado, su empleo se fue extendiendo hasta alcanzar un gran apogeo en la década de los setenta en los países de Centroeuropa, y llegando por entonces, al litoral mediterráneo (Martínez *et al.*, 2009).

En Europa, a través de la Directiva 91/414/CE y posterior Reglamento CE 1107/2009, los pesticidas autorizados se revisaron y su uso se armonizó en los

países europeos. Durante esta evaluación, cerca del 70 % de las materias activas se prohibieron en el mercado. La Directiva 2009/128 CE estableció un marco de acción comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas, teniendo en cuenta los enfoques de precaución y de prevención. El objetivo era “reducir los riesgos y los impactos del uso de plaguicidas en la salud humana y el medio ambiente y a la vez fomentar el desarrollo y la introducción del manejo integrado de plagas junto con técnicas alternativas con el fin de reducir la dependencia del uso de plaguicidas químicos”. Además, en línea con el creciente interés por la seguridad alimentaria (Reglamento CE 10/2001) y por la reducción de la contaminación debida a las emisiones de dióxido de carbono (Directiva 28/2009 CE), esta Directiva fomenta el uso de alternativas no químicas para la protección de plantas. El marco político promueve un cambio estructural en el sistema de producción de alimentos, para conseguir alimentos más saludables en un medio ambiente más limpio.

La prohibición de numerosos pesticidas ha desencadenado la búsqueda de estrategias alternativas y sostenibles para el control integrado de plagas en la agricultura y la horticultura.

#### **1.1.1.1. Biofumigación**

Kirkegaard *et al.* (1993) y Angus *et al.* (1994) emplearon el término **biofumigación** para describir la supresión de patógenos y plagas del suelo con rotaciones de *Brassica* o cultivos para enmienda en verde.

Posteriormente, Bello *et al.* (1999, 2000) definieron la biofumigación como la acción de las sustancias volátiles producidas en la biodegradación de la materia orgánica en el control de los patógenos de las plantas, incrementándose su eficacia cuando se incluyen en un sistema integrado de producción de cultivos. Los gases y otros productos resultantes de la descomposición de enmiendas orgánicas y residuos agroindustriales se utilizan como biofumigantes para el control de los organismos patógenos vegetales (Bello *et al.*, 2003). El efecto biofumigante de las enmiendas orgánicas sobre los patógenos se debe, entre

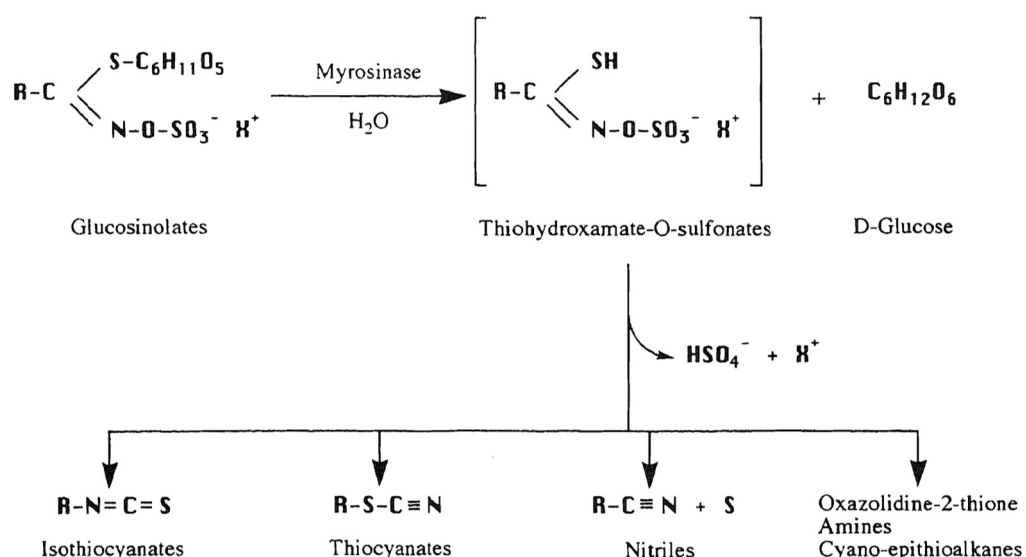
otros factores, a los compuestos tóxicos volátiles, condiciones anaeróbicas y el incremento de la capacidad supresiva del suelo (Bonanomi *et al.*, 2007; Arriaga *et al.*, 2011; Núñez-Zofío *et al.*, 2011, 2012).

Se ha comprobado que, por lo general, cualquier tipo de materia orgánica puede actuar como biofumigante, dependiendo su eficacia de la dosis y del método de aplicación (Bello *et al.*, 2000). La adición de materia orgánica al suelo para mejorar la fertilidad y controlar las plagas y enfermedades es una práctica casi tan antigua como la agricultura; produciendo modificaciones en las características físicas y químicas del suelo, mejorando la disponibilidad de nutrientes utilizables por la planta e incrementando las poblaciones de los nematodos saprófagos (Bello *et al.*, 2004; Díez-Rojo, 2010). Se han ensayado una amplia variedad de materiales como enmiendas al suelo para controlar nematodos, hongos fitoparásitos y flora arvense. Estos materiales incluyen estiércol de ganado, residuos de industrias papeleras y forestales, de industrias pesqueras y de marisqueras, numerosos subproductos de agricultura, alimentación y otras industrias, así como residuos de plantas con compuestos alelopáticos (Hoitink, 1988; Stirling, 1991; Bello *et al.*, 2000).

Las plantas de la familia *Brassicaceae* (Crucíferas) contienen en sus tejidos cantidades considerables de glucosinolatos (GSLs) (Kirkegaard y Sarwar, 1998). Los glucosinolatos son sustancias alelopáticas biosintéticas derivados de aminoácidos (Hill *et al.*, 2003) que se producen en todas las plantas del orden *Capparales* y en algunas otras plantas (Kjaer, 1960; Rodman, 1978; Bjerg y Sørensen, 1987). Estos compuestos, que son relativamente inactivos frente a los microorganismos, son hidrolizados por la isoenzima mirosinasa (Thioglucosidasa; CE 3.2.1.147), que cataliza la hidrólisis de la cadena  $\beta$ -D- tioglucopiranosida (Bjergegaard *et al.*, 1994; Bellostas *et al.*, 2003; Bjergegaard *et al.*, 2003). Como se observa en la Figura 1.1, en la hidrólisis de los GSLs por la enzima mirosinasa se liberan fundamentalmente isotiocianatos (ITCs), así como tiocianatos, nitrilos y otros compuestos en menores proporciones. Los glucosinolatos pueden representar una fuente viable de aleloquímicos de control para una gran variedad

de patógenos del suelo, incluidas las malas hierbas (Kirkegaard y Sarwar, 1998). Los ITCs son potentes biocidas frente a nematodos, bacterias, hongos e insectos (Fenwick *et al.*, 1983; Brown y Morra, 1997; Rosa *et al.*, 1997). Muchos ITCs tienen una potente actividad antimicrobiana como es el caso del metil-ITC, principio activo de algunos de los fumigantes comerciales de suelo más utilizados (Landis y Campbell, 1990).

Las enzimas mirosinasas están separadas de sus sustratos (GSLs) en los tejidos vegetales intactos. Se ha observado que los glucosinolatos se encuentran en las vacuolas de diferentes tipos celulares de la planta (Grob y Matile, 1979; Pocock *et al.*, 1987); por el contrario, la mirosinasa se localiza en gránulos, solo dentro de células especializadas y distribuidas entre las demás células de los tejidos de la planta (Thangstad *et al.*, 1991; Höglund *et al.*, 1992). Debido a que las vacuolas que contienen los glucosinolatos no parecen estar presentes en las células especializadas donde se encuentra la mirosinasa, la separación se produce de forma intercelular y no de forma intracelular. La ruptura de los tejidos celulares permite la mezcla de glucosinolatos y la mirosinasa dando lugar a la liberación rápida de los productos de la degradación de glucosinolatos (Brown y Morra, 1997).



**Figura 1.1.** Hidrólisis de los glucosinolatos por la vía de la mirosinasa (Recuperado de Mari *et al.*, 1993).

Los productos liberados de la hidrólisis presentan formas variadas, son biológicamente activos y con estructuras definidas por el tipo de glucosinolato y las condiciones de la reacción (Bjergegaard *et al.*, 1994; Palmieri *et al.*, 1998; Buskov *et al.*, 2000).

Se han identificado más de 130 glucosinolatos, y más de 30 de ellos están presentes en especies de *Brassica* (Fahey *et al.*, 2001; Sørensen, 2001). El tipo y la concentración de glucosinolatos que se encuentran en la familia *Brassicaceae* varían entre especies (Picón-Toro, 2011; Morales-Rodríguez, 2011; Morales-Rodríguez *et al.*, 2012, 2014), así como entre cultivares de la misma especie (Bradshaw *et al.*, 1984; Kirkegaard y Sarwar, 1998; Doheny-Adams *et al.*, 2018), y consecuentemente la concentración y tipo de productos biocidas producidos por la hidrólisis de estos también varían (Mithen, 1992; Kirkegaard y Sarwar, 1998). Sin embargo, los principales GSLs y sus respectivas proporciones son relativamente estables y predecibles para especies y subespecies concretas (Rosa *et al.*, 1997). Con el fin de alcanzar la cantidad efectiva de GSLs a la hora de su aplicación en campo, hay que tener en cuenta, entre otros factores, la producción de biomasa de la especie y su contenido en glucosinolatos; eligiendo especies con elevadas producciones de biomasa (por ejemplo, *Brassica oleracea*), especies con elevadas concentraciones de GSLs en los tejidos (por ejemplo, *Brassica napus oleífera* bianual) o bien especies con niveles moderados de producción de biomasa y concentración de GSLs (por ejemplo *Brassica nigra*) (Kirkegaard y Sarwar, 1998). Factores tan importantes como la producción de GSLs son la capacidad de estos para liberar ITCs y el tipo de ITC liberado. Así, en el caso de *Brassica napus*, *B. campestris* y *B. oleracea* solo el 50 % del total de GSLs liberan ITCs al hidrolizarse, contrastando con *B. nigra*, *B. carinata*, *B. juncea*, *Sinapis alba* y otras malas hierbas en las que la mayoría de los GSLs que contienen se liberan como ITCs (Kirkegaard y Sarwar, 1998).

Los niveles de glucosinolatos y los compuestos relacionados varían durante el desarrollo de la planta (Bellostas *et al.*, 2004; Morales-Rodríguez, 2011; Morales-Rodríguez *et al.*, 2012) y entre los tejidos de la planta (Clossais-Besnard

y Larher, 1991; Rosa *et al.*, 1996; van Dam *et al.*, 2009). En general, las concentraciones son mayores en las semillas y raíces, y mayores en los tejidos jóvenes en relación con los tejidos más viejos (Clossais-Besnard y Larher, 1991; Rosa *et al.*, 1996; Rosa *et al.*, 1998). Se ha observado que los niveles de glucosinolatos cambian en la germinación de semillas, en el crecimiento temprano y en la iniciación floral (Chong y Bible, 1974; Smith y Griffiths, 1988; Clossais-Besnard y Larher, 1991). Así, la concentración de GSLs en *B. napus* varía durante el desarrollo de la planta (Campbell y Kondra, 1978; Booth *et al.*, 1991). De March *et al.* (1989) examinaron la variación en el contenido de GSLs durante la madurez de la vaina y la existencia de cambios en la concentración de GSLs desde el estado vegetativo hasta la madurez de las plantas en *B. napus*. El contenido total de sinigrina (GSL alifático) se incrementa a lo largo de las fases vegetativas y reproductivas y desciende cuando la planta llega a un estado maduro (Rangkadilok *et al.*, 2002). Del mismo modo, el contenido total e individual de GSLs en *B. napus* var. *oleifera* se incrementa desde el estado vegetativo hasta los estados reproductivo y la madurez (Fieldsend y Milford, 1994). Bellostas *et al.* (2004) también describen cambios en el perfil de los GSLs durante el ciclo de crecimiento en los tejidos de *B. nigra*, *B. carinata*, *B. juncea* y *B. rapa*. Sarwar y Kirkegaard (1998) describieron la evolución del contenido en GSLs con el estado de desarrollo de las plantas de varias especies de crucíferas, el contenido era variable en función de las condiciones ambientales de desarrollo. Factores climáticos, edáficos y bióticos influyen en la concentración de GSLs en los tejidos de las especies de la familia *Brassicaceae* (Rosa *et al.*, 1997). Morales-Rodríguez (2011) observó mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora nicotianae* al usar plantas sometidas a condiciones de estrés debido a la rotura de los tejidos por el efecto del viento y lluvias.

Los efectos fungicidas de los ITCs se conocen desde hace tiempo (Walker *et al.*, 1937; Davis, 1964; Drobnica *et al.*, 1967), y se ha descrito su efecto inhibidor del crecimiento micelial en *G. graminis* (Angus *et al.*, 1994), *Leptosphaeria maculans* (Mithen y Lewis, 1986), *Alternaria brassicicola* y *A. brassicae* (Sellam *et al.*, 2007), *Fusarium oxysporum* (Smolinska *et al.*, 2003),

*F. graminearum*, *R. solani*, *B. sorokiniana*, *P. irregulare* (Sarwar *et al.*, 1998). En condiciones *in vitro* se ha demostrado que los compuestos volátiles liberados de los tejidos de varias crucíferas inhiben la germinación de las clamidosporas de *P. nicotianae* (Rodríguez-Molina *et al.*, 2010a; Picón-Toro *et al.*, 2012a; Serrano-Pérez *et al.*, 2017), *P. cinnamomi* (Morales-Rodríguez *et al.*, 2016), *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, y esclerocios de *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Smolinska y Horbowicz, 1999).

La efectividad de las especies de la familia *Brassicaceae* para biofumigación depende de varios factores además del potencial biofumigante, como son el momento de incorporación al suelo y el estado del organismo que se pretende controlar, la persistencia en el suelo de los compuestos liberados, la eficiencia de la incorporación, la actividad de la enzima mirosinasa, las pérdidas debidas a volatilización, fijación en arcilla y materia orgánica, lavado y degradación microbiana (Brown y Morra, 1997; Kirkegaard y Sarwar, 1998) y pH. Para conseguir óptimos resultados en la biofumigación, el pH del suelo debería estar próximo a 7 (McGuire, 2003).

Se han realizado numerosos ensayos de biofumigación en campo frente a un amplio número de patógenos usando diferentes especies de *Brassicaceae*, siendo los resultados muy variables. En varias publicaciones se concluye que el uso de cubiertas vegetales con brásicas no proporcionó un control eficaz para patógenos como *Pythium* ssp., *R. solani* y *Sclerotium rolfsii* (Hansen y Keinath, 2013), *Verticillium dahliae* (Daugovish *et al.*, 2004), *Fusarium* spp. (Martínez *et al.*, 2010) y *P. nicotianae* (Pérez, 2011). Por el contrario, Ji *et al.* (2012) consiguieron reducir la enfermedad de la Tristeza en plantas de calabacín causadas por *Phytophthora capsici* mediante el uso de abonos verdes con *B. napus* y *B. juncea*. Cheah *et al.* (2008) observaron que la inclusión de la mezcla de brásicas (*B. rapa* y *B. napus*) en las rotaciones aplicadas durante tres años consiguieron reducir el inóculo de *Phytophthora* spp.

Las temperaturas del suelo durante el proceso de biofumigación parecen ser un factor determinante de la efectividad de esta práctica (Njoroge *et al.*, 2008;

Lacasa *et al.*, 2015; Rodríguez-Molina *et al.*, 2015). Morales-Rodríguez *et al.* (2016) señalan el papel crucial de la temperatura en la biofumigación, debido a que la temperatura afecta a la volatilidad y a la concentración de los ITCs generados durante la biofumigación (Price *et al.*, 2005), al igual que afecta a la actividad de la mirosinasa (Al-Turki y Dick, 2003).

#### **1.1.1.2.Solarización**

Katan (1981) definió la **solarización** como una forma de desinfección del suelo aprovechando la energía solar incidente en un suelo humedecido y cubierto con una lámina de plástico (generalmente polietileno transparente). La efectividad de la solarización depende del color del suelo, estructura, humedad edáfica, temperatura ambiente, longitud del día e intensidad de la radiación solar (Souza, 1994). La temperatura alcanzada en profundidades del suelo superiores a los 20 cm es suficiente para reducir las poblaciones de los patógenos, en particular, en áreas de alta insolación y estaciones cálidas del año (Cenis y Fuchs, 1988; Chellemi *et al.*, 1994, 1997; Coelho *et al.*, 1999). La aplicación de este método de desinfección del suelo tiene gran dependencia de las condiciones climáticas, por lo que su utilización queda restringida a zonas con climas áridos en los que se registran altas temperaturas y elevada radiación solar (Chellemi *et al.*, 1994). En estas zonas se ha comprobado su eficacia en el control de numerosos patógenos, tanto hongos como nematodos (Katan y DeVay, 1991). La solarización ha sido recomendada como una técnica adecuada para el control de patógenos de suelo (Katan *et al.*, 1976; Antoniou *et al.*, 2014; Kannan *et al.*, 2014) en regiones subtropicales y áreas con clima mediterráneo, como el Sureste y Oeste de España (Cenis y Fuchs, 1988; Guerrero *et al.*, 2013).

El proceso se debe a la energía solar que es retenida en las capas más superficiales, como diferencia entre la radiación transmitida y la emitida a través de la cubierta de plástico que cubre la superficie del suelo húmedo (Basallote *et al.*, 1994). La humedad del suelo es crítica por depender de ella la transferencia de calor y el mantenimiento de la temperatura durante la noche, permitiendo el



movimiento cíclico del agua en el suelo y las alteraciones gaseosas que facilitan el control de algunos organismos (Martínez *et al.*, 2009).

La época del año en la que se obtienen mejores resultados son los meses de mayor radiación, cuando la temperatura del suelo alcanza fácilmente los 50 °C en los primeros centímetros (Martínez *et al.*, 2009). Por ello, las condiciones ambientales de algunos países mediterráneos pueden determinar que la solarización sea un método alternativo muy efectivo (Minuto *et al.*, 2000; Mauromicale *et al.*, 2010). Al efecto térmico hay que adicionar el derivado de la acumulación de gases procedentes de la descomposición de la materia orgánica que pueda haber en el suelo (Gamliel *et al.*, 2000; Oka, 2010). Además, el sellado plástico supone que se reduzca el contenido en oxígeno en el suelo en la biodescomposición de la materia orgánica, produciéndose situaciones de hipoxia o anoxia, limitando la densidad poblacional de los microorganismos patógenos (Blok *et al.*, 2000).

Los resultados de la solarización en campo son diversos. Lombardo *et al.* (2012) estudiaron el efecto de la solarización y la fumigación química en el control de patógenos en cultivos de tomate en invernaderos. La solarización presentó un mayor control sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Pyrenochaeta lycopersici* que la mezcla de cloropicrina más 1,3-dicloropropeno. La solarización ha sido reportada como un medio de control de *Phytophthora* spp. (Juárez-Palacios *et al.*, 1991) y Lacasa *et al.* (2015) afirmaron que la solarización redujo el inóculo de *P. capsici* y *P. nicotianae* en invernaderos de Murcia en verano.

La solarización depende fundamentalmente de la temperatura, por lo que solo se puede aplicar en determinadas épocas y en países o áreas con una alta radiación solar (Katan y de Vay, 1991), no siendo eficaz en el control de organismos móviles como los nematodos (Escuer, 2004), ni en agricultura extensiva por los altos costes del plástico y la duración del tratamiento (Bello *et al.*, 2003; Bello *et al.*, 2008).

### 1.1.1.3. Biosolarización

La **biosolarización** se define como la combinación de la biofumigación y la solarización o como la solarización con la adición al suelo de restos orgánicos antes de iniciarse el proceso hidrotérmico para el control de patógenos del suelo (Ros *et al.*, 2008). Ramírez-Villapudua y Munnecke (1987) fueron los primeros en combinar la solarización con la biofumigación usando residuos vegetales para el control de *Fusarium*. La combinación de la solarización con la biofumigación muestra efectos sinérgicos de los dos métodos aplicados por separado (Katan, 2005). Así, el sellado del suelo con el plástico durante el proceso de solarización no solo contribuye a calentar más el suelo sino que retiene los gases de la descomposición de los aportes orgánicos (Gamliel *et al.*, 2000; Oka, 2010). Pero si el humedecimiento del suelo realizado para la solarización alcanza niveles de saturación, en el proceso de descomposición de la enmienda orgánica, además de la liberación de gases, se produce anaerobiosis que afecta a fitoparásitos y patógenos (Blok *et al.*, 2000).

Ploeg (2000) determinó que la combinación de solarización y biofumigación con brócoli en cultivos de melón es eficaz en el control de *Meloidogyne incognita*. Con la biosolarización, el suelo se calienta en mayor medida y el plástico permite la acumulación de los gases generados (Pérez *et al.*, 2014). Las altas temperaturas acentúan el efecto de la biofumigación (Ploeg *et al.*, 2001). Guerrero (2012) indica que la temperatura del suelo alcanzada en el periodo de biosolarización parece ser determinante de la eficacia desinfectante, siendo reducido el efecto de la enmienda. Lacasa *et al.* (1999) señalan que la solarización es eficaz cuando se combina con biofumigación, durante dos meses, a una temperatura ambiental superior a 40 °C, aunque se recomienda de 30 a 45 días durante los meses de julio y agosto, que es cuando la temperatura del suelo alcanza temperaturas superiores a 50 °C. La biosolarización utilizando estiércol fresco de oveja y gallinaza como enmienda orgánica y sellando el suelo con plástico de polietileno después del humedecimiento del suelo, ha proporcionado aceptables niveles de control de *P. capsici* cuando se ha reiterado en el mismo

suelo en años consecutivos en invernaderos del Campo de Cartagena (Murcia), siendo deficientes cuando se aplica por primera vez y los niveles de inóculo son elevados (Guerrero *et al.*, 2004a, 2004b). Lacasa *et al.* (2015) concluyeron que la biosolarización con brásicas es un método efectivo para reducir la supervivencia de *Phytophthora* en suelos de cultivos de pimiento en invernaderos de Murcia, obteniéndose mejores resultados en el control del inóculo de *P. nicotianae* que en el de *P. capsici*. Tello-Marquina y Camacho (2010) determinaron que la solarización combinada con restos de cultivo de crisantemo y clavel con gallinaza, fue más efectiva que el bromuro de metilo en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, evidenciándose el papel clave del plástico en la retención de las moléculas fungicidas. Estos autores concluyeron que en la biosolarización, el suelo se calienta en mayor medida y el plástico permite la acumulación de los gases generados. Además de los gases liberados se producen condiciones de anaerobiosis. La anaerobiosis se acentúa cuando se utilizan plásticos impermeables a los gases (Virtually impermeable film, VIF) para sellar el suelo (Blok *et al.*, 2000).

### 1.1.2. El suelo

El suelo es la capa superficial de la corteza terrestre que desempeña una serie de funciones clave, tanto medioambientales como sociales y económicas, para el desarrollo de la vida. La agricultura y la silvicultura dependen de los suelos para el suministro de agua y nutrientes, así como para su soporte físico. La capacidad de almacenamiento, filtración, retención y transformación convierten al suelo en uno de los principales elementos para la protección de las aguas y el intercambio de gases con la atmósfera. Además, constituyen un hábitat y una reserva genética, un elemento del paisaje y del patrimonio cultural así como una fuente de materias primas [COM (2002)179].

El estudio del suelo ha estado ligado tradicionalmente a las necesidades de la agronomía. Aumentar los rendimientos agrícolas era el primer objetivo que guiaba el manejo del suelo en un modelo agrario basado en principios similares a los de cualquier actividad industrial (Labrador, 2008). Estas prácticas

agronómicas tienen un fuerte impacto sobre el suelo, el medio ambiente y la salud de las personas (Bello *et al.*, 2008).

Stolte *et al.* (2016) señalaron las principales amenazas del suelo que están presentes en la Unión Europea: erosión, pérdida de materia orgánica, compactación, salinización, contaminación, desprendimientos de tierras, sellado y pérdida de biodiversidad. La degradación del suelo es una realidad y, por ello, es necesaria su protección.

En los últimos años han surgido nuevos modelos de gestión que tratan de minimizar la intensificación de la agricultura industrial y la degradación de los suelos. La agroecología aborda de forma integral la gestión agraria, dada la complejidad del suelo como sistema y tiene como objetivo principal el conocimiento de elementos y procesos claves que regulan el funcionamiento de los agrosistemas, con el fin de establecer las bases científicas para una gestión eficaz de los sistemas agrarios, en armonía con el ambiente (Bello *et al.*, 2008). El enfoque agroecológico considera la fertilidad como la capacidad de un suelo de cultivo de mantener de manera perdurable, un nivel de producción estable y de calidad, conservando un estado de alta estabilidad frente a los procesos que implican su degradación además de un alto grado de resiliencia (Labrador, 2008). Por tanto, la fertilidad es una expresión del estado de los componentes y de los procesos biológicos, químicos y físicos de un suelo. Las actuaciones para el manejo eficiente de la fertilidad deben ir enfocadas al conocimiento de los parámetros que la determinan y posteriormente a las interacciones entre esos parámetros con los factores bióticos del agrosistema.

Los factores que determinan la fertilidad se pueden clasificar en:

- Físicos: condicionan el desarrollo del sistema radicular y el aporte hídrico. La fertilidad física es función de la textura del suelo, de la estructura y de la estabilidad de los agregados, que influyen en la porosidad, densidad aparente, permeabilidad y penetrabilidad.

- Químicos: definen el estado físico-químico del medio, la reserva y disponibilidad de nutrientes. La fertilidad química viene determinada por el pH, la conductividad eléctrica, la capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica y el contenido de macronutrientes y micronutrientes.
- Biológicos: determinados por la actividad de los microorganismos del suelo. La microbiota del suelo utiliza la materia orgánica como sustrato y fuente de energía, interviniendo en la producción de enzimas, ciclo del carbono y del nitrógeno, transformaciones biológicas de nutrientes y procesos de humificación y mineralización (Bernal, 2004).

El manejo de la fertilidad de los suelos de cultivo está ligado a la utilización de la fertilización orgánica, ya que el contenido de materia orgánica en el suelo está estrechamente unido con el potencial productivo y el grado de resistencia frente a la erosión y degradación (Labrador, 2008). La materia orgánica desempeña distintas funciones clave en los agrosistemas al actuar sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Labrador, 2008).

Las características edafoclimáticas de ciertas áreas, como la zona mediterránea, favorecen los procesos de degradación y mineralización de la materia orgánica del suelo, provocando una pérdida de materia orgánica. Esta pérdida afecta negativamente a las diferentes propiedades del suelo (Bernal, 2004).

En Extremadura, los suelos de las Vegas del Guadiana tienen una clara aptitud agrícola y durante siglos se han cultivado de forma tradicional. La necesidad de incrementar la producción para aumentar la competitividad ha conducido a una situación en la que algunos de los mejores suelos están afectados por procesos erosivos que, aunque no son destacables, tienen consecuencias negativas desde el punto de vista económico y ambiental (Peña, 2013).

El mantenimiento de un nivel adecuado de materia orgánica es decisivo para la conservación de la funcionalidad de los suelos agrícolas (Labrador, 2008).

La adición de enmiendas y residuos orgánicos a los suelos es una práctica común que está muy extendida en España y otros países de clima mediterráneo, donde los suelos se caracterizan, en general, por su bajo contenido en materia orgánica, debido al predominio de los procesos de mineralización frente a los de humificación (Peña, 2013).

#### **1.1.2.1.Efecto de las técnicas de control de patógenos en las propiedades del suelo**

Tanto en sistemas agrarios convencionales como en agricultura ecológica, se ha propuesto la incorporación de enmiendas orgánicas al suelo como una estrategia para mejorar las propiedades del suelo. La adición de enmiendas orgánicas puede modificar las propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo (López-Piñeiro *et al.*, 2011). No obstante, la respuesta de los suelos de los aportes de materiales orgánicos no va a ser siempre la misma, ya que va a depender de su naturaleza y de su calidad (Fernández *et al.*, 2004; Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Tejada *et al.*, 2008).

Uno de los retos de la agroecología es convertir y revalorizar los residuos que genera la actividad productiva (estiércol, restos de cosecha, residuos agroindustriales, etc.,) en recursos que contribuyan a una mejora de los suelos, permitiendo una reducción del consumo energético en los agrosistemas (Guzmán-Casado *et al.*, 1999).

Las enmiendas orgánicas influyen principalmente en las comunidades microbiológicas, incluidos algunos hongos patógenos saprófitos debido a que utilizan los materiales aportados como fuente de alimento (Bending *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2011). Estos cambios en la microbiota pueden influir en todo el ecosistema del suelo a través de la interacción trófica con la red nutritiva del suelo (Schutter *et al.*, 2001). La aplicación de materia orgánica podría directa o indirectamente cambiar la incidencia de una enfermedad causada por hongos patógenos habitantes del suelo (Pérez, 2014), ya que a través del aumento de la

actividad y biomasa microbiana, puede contribuir a mejorar la supresividad<sup>1</sup> del suelo (Bonanomi *et al.*, 2007; Janvier *et al.*, 2007). Los mecanismos involucrados en el control de patógenos mediante el aporte de enmiendas orgánicas pueden ser de diversa índole, incluyendo la acción de los compuestos que resultan tóxicos (Tsao y Oster, 1981; Shetty *et al.*, 2000), la alteración de las propiedades del suelo que afectan a la supervivencia de los organismos (Keinath, 1996), la estimulación de la actividad de los organismos de control biológico (Dutta e Isaac, 1979) así como la mejora e inducción de resistencias (Hoitink y Boehm, 1999).

La biofumigación es una técnica para el control de patógenos que mejora las características del suelo y la nutrición de la planta, incrementa el número de nematodos saprófagos, además induce cambios microbiológicos, con una proliferación inicial de microorganismos que depende de los recursos añadidos (Bello *et al.*, 2004). Mitidieri *et al.* (2009) señalaron que la biofumigación puede provocar un cambio en la composición de la microbiota del suelo y aumentar la proporción de los antagonistas. Wang *et al.* (2014) mostraron que la biofumigación con harina de semilla de colza redujo la infectividad de *Phytophthora capsici* a través de las alteraciones en la comunidad microbiana del suelo.

La incorporación de enmiendas orgánicas en forma de abonos verdes tiene efectos benéficos sobre el desarrollo de los cultivos siguientes, ya que aumenta el contenido de materia orgánica del suelo, mejorando la estructura y la penetración del agua en el mismo (Pung, 2003; Kirkegaard y Matthiessen, 2004). Se han observado incrementos en la producción de cultivos en aquellos suelos en

---

<sup>1</sup> Supresividad: concepto holístico inspirado en la propiedad de homeostasis de los ecosistemas estables, es decir, de su resistencia al cambio, la cual impide o frena la introducción o el éxito de especies patógenas (Núñez-Zofío, 2011).

Según Baker y Cook (1974), la supresividad de un suelo viene mediada por diferentes mecanismos: (i) el patógeno no se establece y/o persiste, (ii) el patógeno se establece pero no causa daño o el daño que causa es mínimo, o (iii) el patógeno se establece y causa daño por un tiempo pero el daño es poco importante a pesar de que el patógeno es capaz de persistir en el suelo.

los que se han aplicado tratamientos biofumigantes (Mattner *et al.*, 2008; Mitidieri *et al.*, 2009; Hansen y Keinath, 2013; Wang *et al.*, 2014).

La biosolarización tiene varios efectos beneficiosos, como la mejora de las propiedades físico-químicas del suelo, el control de patógenos y la obtención de mejores cosechas comerciales, obteniendo unos resultados similares a los obtenidos con la fumigación con bromuro de metilo (Ros *et al.*, 2008). Fernández *et al.* (2004) obtuvieron una mejora de la velocidad de infiltración, una reducción de los efectos depresivos y mermas en rendimientos de la cosecha al biosolarizar el suelo aportando estiércoles de origen animal. La mejora de las características físicas del suelo por el aporte de materia orgánica mediante biosolarización podrían explicar la reducción de la fatiga en algunos invernaderos del Campo de Cartagena (Guerrero, 2012).

Núñez-Zofío *et al.* (2012) estudiaron el efecto reiterado de la biosolarización, con diferentes enmiendas orgánicas, en el control de *Phytophthora* spp. y en las propiedades del suelo. Esta técnica mejoró las propiedades hídricas del suelo al reducir la densidad aparente y aumentar la infiltración. Los suelos biosolarizados mostraron valores más altos en las propiedades físico-químicas y microbianas del suelo que los suelos no tratados (control).

En relación a la solarización, el modo de acción es complejo, implica una destrucción térmica directa de los propágulos, cambios en la actividad microbiana, y cambios en las propiedades físico-químicas del suelo (Gamliel y Stapleton, 1993). Las temperaturas alcanzan ciertos niveles que son letales para muchos fitopatógenos, al mismo tiempo se producen cambios físicos y biológicos en el suelo que contribuyen al efecto biocida (Chen y Katan, 1980; Pullman *et al.*, 1981; Ristaino *et al.*, 1991). Cullman *et al.* (2006) indican que la solarización durante varias semanas ayuda a controlar los hongos patógenos y los nematodos fitoparásitos, además puede tener varios efectos indirectos en la biota edáfica, incrementando la competencia o estimulando los organismos termotolerantes. Lombardo *et al.* (2012) señalan que la solarización consiguió controlar



satisfactoriamente los patógenos del tomate y malas hierbas, al mismo tiempo que mejoró la producción del cultivo de tomate. La aplicación de la solarización en diferentes estudios ha resultado en una mejora del crecimiento de las plantas e incremento de las cosechas (Gamliel y Stapleton, 1993; Lira-Saldívar *et al.*, 2004; Mauromicale *et al.*, 2005), además de inducir supresividad frente al restablecimiento de hongos patógenos en suelos tratados (Greenberger *et al.*, 1987; Gamliel y Katan, 1993). Estos efectos pueden ser parcialmente atribuidos, al incremento de las poblaciones beneficiosas de hongos y bacterias en la rizosfera y raíces de las plantas cultivadas en suelos solarizados (Chen *et al.*, 1991; Gamliel y Katan, 1991; Gamliel y Katan, 1993).

### **1.1.3. La tristeza del pimiento y la fusariosis vascular del tabaco: dos enfermedades causadas por hongos fitopatógenos del suelo**

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades pre y postcosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo estos responsables de cuantiosas pérdidas económicas. El daño que ocasionan no solo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, debido a la alteración en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedadoras atacadas por estos microorganismos (Agrios, 2005). Los patógenos del suelo constituyen un componente crítico en los agrosistemas, ya que desempeñan diversas funciones ecológicas que inciden en la producción de alimentos (Ellouze *et al.*, 2014) y son los causantes de las mayores pérdidas ocasionadas en algunos cultivos de gran importancia económica en el sur de Europa (Gullino, 2000). Estas pérdidas conducen a la aplicación de miles de toneladas de agroquímicos en todo el mundo, y a la necesidad persistente de desarrollar nuevos fungicidas más eficaces y respetuosos con el medio ambiente (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).

Existen más de 8.000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas (Rodríguez *et al.*, 2001), estas pueden ser infectadas y dañadas por

más de una especie de hongo fitopatógeno, y de igual forma, una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie (National Academy of Sciences, 1980; Agrios, 1988).

Algunos géneros y especies fúngicas presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución (Cook y Baker, 1983). Esta capacidad adaptativa de los hongos fitopatógenos depende del grado de relación hongo-hospedador. Los hongos fitopatógenos telúricos pueden sobrevivir durante varios años en el suelo en forma de estructuras de resistencia y causar graves pérdidas en distintos cultivos haciendo que extensas zonas agrícolas dejen de ser adecuadas para el cultivo (Ambrósio *et al.*, 2009). Las estructuras de resistencia, como clamidosporas y microesclerocios, permanecen libres y quiescentes en el ambiente edáfico hasta que son estimuladas por un potencial huésped, o merced a su capacidad de crecimiento saprofítico en ausencia de este (Jiménez-Díaz *et al.*, 2004). Estos hongos infectan los tejidos subterráneos de la planta susceptible causando lesiones necróticas y podredumbres del sistema radical (p.ej. *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp.), marchiteces vasculares (p.ej. *F. oxysporum* spp., *Verticillium* spp.) y muerte de plántulas (p.ej. *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp.).

La complejidad del ecosistema edáfico, y en particular de las enfermedades que afectan al sistema radical de la planta, dificultan el control eficiente de estas (Jiménez-Díaz *et al.*, 2004), siendo esencial el manejo de estos hongos, para optimizar la productividad y la sostenibilidad de los sistemas agrarios (Ellouze *et al.*, 2014). La mayoría de los trabajos de investigación se centran en los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium* debido al amplio rango de plantas hospedantes que atacan, a su distribución cosmopolita y a los elevados daños económicos que provocan en cultivos de importancia económica (Rodríguez *et al.*, 2001). Dean *et al.* (2012) publicaron la lista de los 10 hongos fitopatógenos considerados de mayor importancia económica y/o científica. El orden de la lista fue el siguiente: (1) *Magnaporthe oryzae*; (2) *Botrytis cinerea*; (3) *Puccinia* spp.;

(4) *Fusarium graminearum*; (5) *Fusarium oxysporum*; (6) *Blumeria graminis*; (7) *Mycosphaerella graminicola*; (8) *Colletotrichum* spp.; (9) *Ustilago maydis*; (10) *Melampsora lini*. Clarkson *et al.* (2015) criticaron este ranking por la ausencia de especies de los géneros *Verticillium* y *Phytophthora*, considerados de gran importancia, dada su incidencia en una amplia gama de cultivos tradicionales en toda Europa. *Phytophthora* se encuentra entre los géneros más importantes de los hongos fitopatógenos y ha sido objeto de cuatro libros importantes en menos de veinte años (Erwin y Ribeiro, 1996).

Dos cultivos representativos y de gran importancia socioeconómica para la Comunidad Autónoma de Extremadura, como son el pimiento (*Capsicum annuum* L.) para pimentón y el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), son afectados por enfermedades fúngicas de origen edáfico: la tristeza del pimiento y la fusariosis vascular del tabaco.

### **1.1.3.1. La tristeza del pimiento**

A nivel mundial, la Tristeza o Seca del pimiento es una de las amenazas más graves para la producción de *Capsicum* (Tian y Babadoost, 2004). Esta enfermedad presenta la mayor trascendencia económica en el cultivo de esta especie hortícola en los países mediterráneos (Palazón y Palazón, 1989). A pesar de que la enfermedad se conoce en España desde la antigüedad, la primera publicación data de 1964 (Davila, 1964), y no fue hasta 1970 cuando la enfermedad fue considerada como una epidemia en este país (Bartual *et al.*, 1991). Esta enfermedad se presenta como limitante del cultivo en áreas de producción del pimiento con deficiencias en los drenajes o suelos altamente contaminados dadas las dificultades de control (Tello y Lacasa, 2004).

Las plantaciones de pimiento para pimentón de los valles del norte de Extremadura están afectadas por esta enfermedad.

### **1.1.3.1.1. El cultivo de pimiento para pimentón**

Las regiones de España donde se cultiva pimiento para pimentón son Extremadura, Murcia, Alicante, Ávila y Baleares. Entre estas destacan especialmente las dos primeras, siendo consideradas de marcada tradición pimentonera (Pereira-Jiménez *et al.*, 2011). Este es el cultivo hortícola, de entre los importantes, que mayor descenso de superficie ha sufrido. Dos razones justifican este hecho: por un lado, la fuerte subida del coste de la mano de obra ocurrida a finales de los años setenta, que comprometió la rentabilidad de una producción en la que no se había abordado la mecanización de la recolección y, por otro lado, la entrada masiva de pimientos secos procedentes de otras zonas del mundo capaces de producir mucho más barato que los agricultores extremeños y murcianos (Bartolomé-García *et al.*, 2013).

El pimiento para pimentón es uno de los cultivos más característicos de Extremadura, localizándose su producción en los valles de los ríos Tiétar, Alagón, Árrago y Ambroz, al norte de la provincia de Cáceres. En el valle del Tiétar se encuentra la Comarca de La Vera, de la que toma nombre el pimentón de Cáceres, conocido como “Pimentón de la Vera”. Para asegurar la calidad del pimentón y proteger el producto autóctono, el Gobierno Autonómico de Extremadura aprobó en 1991 el Reglamento de la Denominación de Calidad “Pimentón de la Vera”, y en el año 1998 el Reglamento de la Denominación de Origen “Pimentón de la Vera”. Posteriormente, se aprobó el Reglamento de la Denominación de Origen Protegida (D.O.P.) “Pimentón de la Vera” en el año 2005; cuyo objetivo es controlar y proteger la calidad, además de, asegurar la trazabilidad de un pimentón que se diferencia de otros: por su aroma y sabor ahumados, estabilidad de color y fuerte poder antioxidante.

El Reglamento de la D.O.P. define al “Pimentón de La Vera” como el “producto obtenido de la molienda de frutos totalmente rojos, de la especie *C. annuum* var. *longum* L., de las variedades del grupo de las “Ocales”, Jaranda, Jariza y Jeromín, y de la especie *C. annuum* L., la variedad Bola, recolectados

maduros, sanos, limpios, con el color característico de la variedad, libres de ataques de plagas o enfermedades, secados con leña de encina y/o roble, por el sistema tradicional de La Vera, y que proceda de la zona de producción”. Esta comprende 53 términos municipales pertenecientes a las comarcas de La Vera, Campo Arañuelo, Valle del Alagón y Valle del Ambroz.

El cultivo de pimiento para pimentón se ha estabilizado en esta comunidad y la superficie de este cultivo ha pasado de 331 ha en 1991 a más de 1.200 ha en el año 2014, lo que representa el 70 % de toda la superficie que se cultiva en toda España (MAPAMA). En Extremadura, la superficie cultivada de pimiento para pimentón fue de 1.576 ha que produjeron 4.776 T en el año 2017 (Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio, 2018). Los cultivares Jaranda y Jariza son los recomendados por la Denominación de Origen en su Reglamento de 1998. Actualmente es el cultivar Jaranda el que se cultiva de forma mayoritaria, seguido por el ecotipo Bola (información proporcionada por el Consejo Regulador de la D.O. Pimentón de La Vera).

El pimiento para pimentón es un cultivo que ha estado al margen de la aplicación de innovaciones tecnológicas en todos los procesos que intervienen para obtener el producto final. Se trata de un cultivo de gran importancia social, que necesita mucha mano de obra, ya que la recolección no está mecanizada. Dado que la recolección manual supone entre el 30 y el 35 % de los gastos totales de cultivo, la mecanización de este cultivo se considera necesaria para asegurar la viabilidad de la producción (Bartolomé-García *et al.*, 2013). Además, el secado tradicional con corriente vertical con humo de leña de encina es realizado por el agricultor, que cuenta con instalaciones de secado en su propia explotación. Posteriormente, el pimiento seco es molido en alguna de las veinticuatro industrias molineras de la zona, de las que trece están acogidas a la D.O.P. Pimentón de la Vera (Bartolomé-García *et al.*, 2006).

En el año 2006 se inició, en el marco del Plan Regional de Investigación de la Junta de Extremadura, el proyecto de investigación “Etiología y epidemiología de la “tristeza” del pimiento en los valles de los ríos Tiétar y Alagón”. Las prospecciones realizadas en las parcelas de cultivo de pimiento pusieron de manifiesto la gravedad de la enfermedad en determinadas zonas, especialmente en el valle del Alagón.

En estas zonas agrícolas de Extremadura, la desinfección del suelo con 1,3 dicloropropeno era una práctica común en cultivos de tabaco que precedían al cultivo de pimiento en el sistema de rotación (Lacasa *et al.*, 2015). Los productos fitosanitarios formulados a base de 1,3 dicloropropeno y de cloropicrina son los únicos sustitutos eficaces del bromuro de metilo. La Comisión Europea mediante la Decisión de 20 de septiembre de 2007 (2007/619/CE) determinó la no inclusión del 1,3 dicloropropeno en el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE y la retirada de los productos que lo contuvieran. La prohibición del bromuro de metilo y las limitaciones del uso de otros desinfectantes químicos del suelo (1,3 dicloropropeno y cloropicrina) han creado la necesidad de evaluar otras formas para el control de patógenos de suelo (Colla *et al.*, 2012).

La Orden de 8 de abril de 2010, por la que se aprueba la Norma Técnica Específica de Producción Integrada de Pimiento para pimentón en la Comunidad Autónoma de Extremadura, ordena el establecimiento de un programa de rotación de cultivo, recomienda no repetir el cultivo de pimiento en la misma parcela al año siguiente y prohíbe repetir el cultivo en la misma parcela si hubo ataque de *Phytophthora* la campaña anterior. El uso del metalaxil-M (mefenoxam) solamente se autoriza como tratamiento preventivo en parcelas afectadas en años anteriores. Desde su introducción en 1977, el metalaxil y su más reciente isómero mefenoxam, han sido amplia e intensivamente utilizados para el control de enfermedades causadas por *Oomycetes* en numerosos cultivos, y es uno de los pocos productos permitidos actualmente en Extremadura. El desarrollo de resistencias al metalaxil y mefenoxam han sido frecuentemente detectadas en varias especies de *Phytophthora* y *Oomycetes* (Timmer *et al.*, 1998; Moorman y

Kim, 2004; Hwang y Benson, 2005). Morales-Rodríguez *et al.* (2014) sugirieron que la aplicación de mefenoxam podría ser una solución para el control de la enfermedad causada por *Phytophthora nicotianae* en el cultivo de pimiento en Extremadura, pero su uso podría incrementar la resistencia.

#### **1.1.3.1.2. Síntomas de la enfermedad de la tristeza y agente causal**

Los síntomas más frecuentes de la enfermedad de la tristeza del pimiento son un marchitamiento brusco (tristeza) y total (seca). Las hojas se tornan flácidas con pérdida de turgencia de los tejidos, manteniendo su color verde un cierto tiempo, hasta que, finalmente, terminan por secarse (Palazón y Palazón, 1989). Estos síntomas se encuentran relacionados con un desequilibrio hídrico de la planta (Palazón y Palazón, 1989). En prospecciones realizadas en plantaciones de pimiento (Figura 1.2) de los valles del Tiétar y el Alagón (Cáceres) en 2006, 2007 y 2008, en las plantas afectadas de tristeza se observaron, además, necrosis en las raíces principales y en las secundarias y adventicias, con pérdidas más o menos acusadas del sistema radicular, y chancros en el cuello (Rodríguez-Molina *et al.*, 2010b; Morales-Rodríguez, 2011). El término tristeza responde a una sintomatología característica y no a un agente patógeno concreto por lo que la etiología de la enfermedad debe contrastarse en cada caso (Palazón y Palazón, 1989).

*P. capsici* es el principal agente causal de la tristeza del pimiento en todo el mundo (Erwin y Ribeiro, 1996; Lamour *et al.*, 2012), aunque otras especies de *Phytophthora* e incluso otros géneros fúngicos también se han descrito como implicados en la tristeza.





**Figura 1.2.** Parcela de pimiento para pimentón con plantas presentando síntomas de tristeza. Prospección en la campaña 2007 (Recuperado de Morales-Rodríguez, 2011).

*P. capsici* fue descrito como el agente causal de la tristeza en el valle del Ebro (Alfaro y Vegh, 1971) pero posteriormente se evidenció una mayor incidencia de *Verticillium dahliae* en esta zona (Palazón, 1988), en cultivos de pimiento en invernadero en Almería (Cuadrado y Gómez, 1983), en la Comunidad Valenciana (Tello y García, 1977; Tuset, 1977) y en la Comunidad de Murcia (Tello, 1984; Tello y Lacasa, 2004). Sin embargo, los estudios de campo entre 1997 y 2006 indican que *P. capsici* y *P. nicotianae* son los principales patógenos del cultivo de pimiento en invernaderos en el Sureste de España (Murcia). Además, *P. nicotianae* predomina en los invernaderos comerciales de Murcia (Pérez, 2011; Guerrero *et al.*, 2013; Lacasa *et al.*, 2013; Blaya *et al.*, 2014). En los pimentonales de la zona interior de Andalucía parece predominar *P. nicotianae* sobre *P. capsici*, pero no parece haber incidencia de *V. dahliae* (Larregla, 2003). En Castilla-La Mancha es *P. nicotianae* la especie causante de la enfermedad en cultivos al aire libre en Toledo y Ciudad Real (Bartual *et al.*, 1991). En Galicia destacan *P. capsici*, *V. dahliae*, *P. nicotianae* y *R. solani* como hongos responsables de la tristeza del pimiento (Andrés-Ares *et al.*, 2005). En el País Vasco, *P. capsici*, *P. cryptogea* y *V. dahliae* son los agentes causales de la tristeza tanto en cultivo en suelo como en hidropónico (Larregla, 2003).



En Extremadura, Rodríguez-Molina *et al.* (2010b) identificaron a *P. nicotianae* como el principal agente causal de la tristeza de pimiento en la comarca de la Vera (Cáceres), sin que en las prospecciones realizadas en la zona se aislara ninguna otra especie de *Phytophthora* ni de *Verticillium* de las plantas con síntomas de la enfermedad.

#### 1.1.3.1.2.1. Género *Phytophthora* de Bary

Inicialmente las especies del género *Phytophthora* spp. (del griego *phyto* = planta y *phthora* = destructor) se clasificaron como hongos (Reino *Myceteae*) (Whittaker, 1969). Investigaciones posteriores han reconocido que este género exhibe grandes diferencias en cuanto a sus características morfológicas con los organismos clasificados dentro de ese Reino (Erwin y Ribeiro, 1996). Desde la VII edición del *Dictionary of the Fungi* (Hawksworth *et al.*, 1995) y hasta la actualidad, el género *Phytophthora* se encuentra situado taxonómicamente en el reino *Chromista*, dentro de filo *Oomycota*, clase *Oomycetes*, orden *Pythiales*, familia *Pythiaceae*.

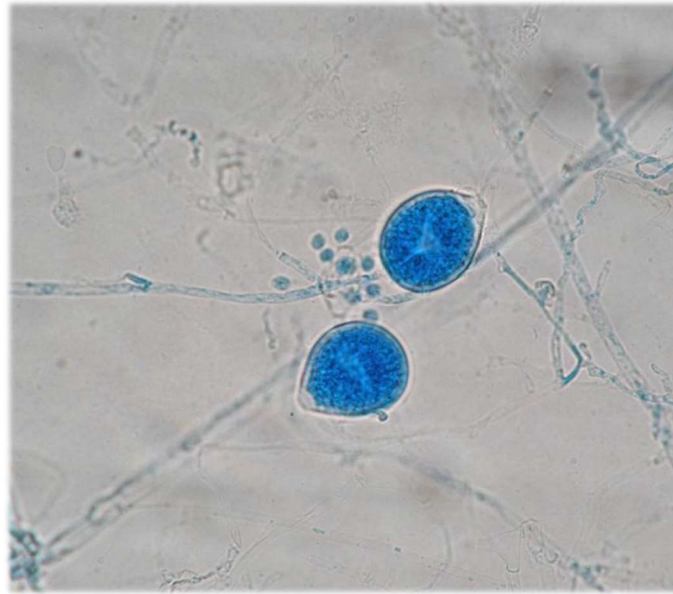
Varias de las características que diferencian a los *Oomycetes* se basan en criterios ultraestructurales y bioquímicos, como una pared celular compuesta de  $\beta$ -1,3-glucanos,  $\beta$ -1,6-glucanos y  $\beta$ -1,4-glucanos (celulosa) (Bartnicki-Garcia, 1969, 1970; Bartnicki-Garcia y Wang, 1983). *Phytophthora* tiene un genotipo diploide durante la mayor parte de su ciclo vital y de manera natural son microorganismos heterocigóticos (Erwin, 1983).

El género *Phytophthora* está estrechamente relacionado con el género *Pythium* y se incluyen en la familia *Pythiaceae*. Ambos géneros presentan un micelio coenocítico (micelio multinuclear en el cual los núcleos no están separados por paredes celulares) y en agua producen esporangios (zoosporangios) que liberan zoosporas biflageladas. *Pythium* y *Phytophthora* pueden diferenciarse rápidamente por la morfología de los esporangios, clamidosporas y oosporas, pero es la formación de zoosporas dentro del esporangio de *Phytophthora* la característica más distintiva de este género comparado con *Pythium*. Los

esporangios de *Phytophthora* son siempre terminales y con variaciones de las formas ovoides y obpiriformes, mientras que los esporangios de *Pythium* pueden ser, dependiendo de la especie, globosos, lobulados o incluso filamentosos y frecuentemente intercalares (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las especies de *Phytophthora* producen esporas asexuales bajo condiciones ambientales adecuadas, las cuales normalmente incluyen un óptimo de temperatura y humedad (Erwin y Ribeiro, 1996). La espora asexual más común y característica es el esporangio o zoosporangio, que como su nombre indica actúa como de recipiente para las zoosporas. Los esporangios varían en su forma y tamaño; hay formas que son distintivas para especies en particular, pero a menudo son variables, de manera que los esporangios pueden ser esféricos, subesféricos, ovoides, elipsoides, limoniformes, piriformes, obpiriformes, etc.

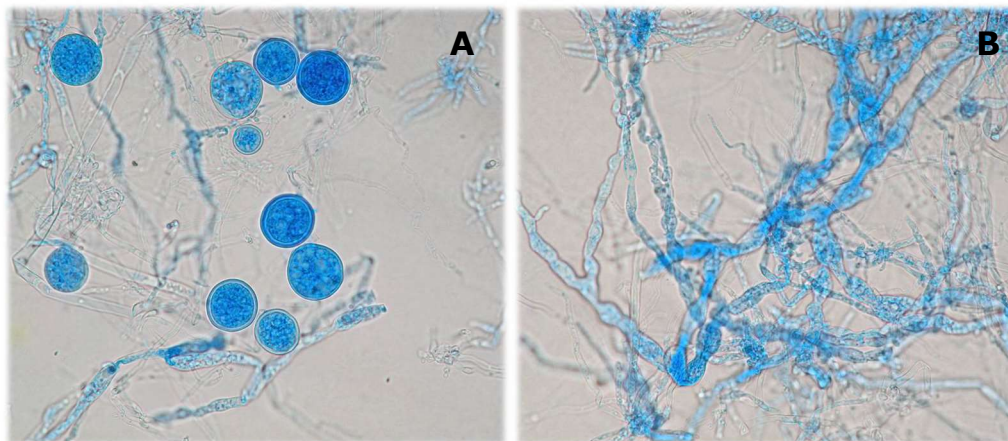
Algunas especies producen esporangios que presentan en su extremo un botón denominado papila. Las especies se han clasificado en grupos según la presencia o ausencia de papila y por el grado de protuberancia de la misma, distinguiéndose esporangios papilados, semipapilados y no papilados (Waterhouse, 1963; Blackwell, 1949; Newhook *et al.*, 1978; Stamps *et al.*, 1990). Los esporangios germinan en soluciones acuosas o en medios de agar mediante la producción de un tubo germinativo que normalmente, pero no siempre, emerge del extremo del esporangio (germinación directa) o en medios acuosos por la producción y liberación de las zoosporas (Figura 1.3) contenidas en el esporangio (germinación indirecta). Las zoosporas se consideran como el propágulo más infeccioso (Erwin y Ribeiro, 1996), pueden nadar durante horas (Bimpong y Clerk, 1970) y cuando cesan de nadar son capaces de desarrollar en pocos minutos una pared celular (Bartnicki-Garcia, 1973). En este estado la espora se denomina quiste. El enquistamiento es inducido por agitación artificial o naturalmente debido al choque con superficies sólidas. Las zoosporas enquistadas germinan mediante la formación de tubos germinativos y micelio.



**Figura 1.3.** Esporangios y zoosporas liberadas de *Phytophthora nicotianae* al microscopio óptico teñidos con azul de lactofenol (Esta tesis).

La producción de esporangios y zoosporas es el principal medio por el cual se incrementa el número de unidades infecciosas. Las zoosporas son atraídas quimiotácticamente por las raíces y en soluciones acuosas migran a la zona de elongación, que es la región con mayor exudación de las raíces (Goode, 1956; Zentmyer, 1961).

Las clamidosporas presentan diferentes formas en un rango que va de una forma esférica a oval (Figura 1.4.A). Pueden formarse en el extremo de la hifa (terminales) o ser intercalares, localizándose entre el extremo y la base de la hifa. La pared de la clamidospora no es tan gruesa como la de la oospora (mayor de 3  $\mu\text{m}$ ) (Hemmes, 1983). Estas estructuras pueden diferenciarse de los hinchamientos hifales porque están separadas del micelio por septos (Blackwell, 1949; Hemmes y WoWong, 1975; Hemmes, 1983).



**Figura 1.4.** **A** Clamidosporas de *Phytophthora nicotianae* teñidas con azul de lactofenol (Recuperada de Picón-Toro, 2011). **B.** Hinchamientos hifales de *Phytophthora nicotianae* teñidos con azul de lactofenol (Recuperada de Picón-Toro, 2011).

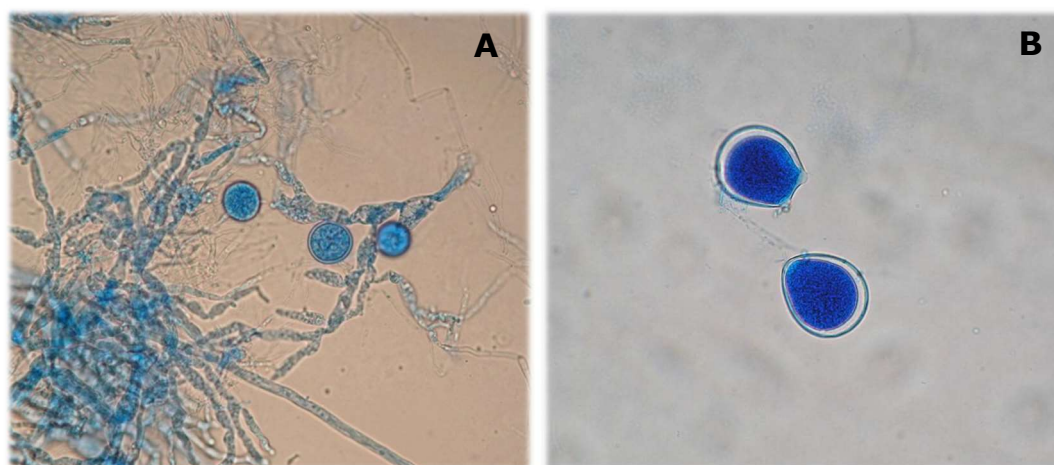
Los hinchamientos hifales son globosos e irregulares en su forma (Figura 1.4.B), normalmente hialinos, terminales o intercalares, se encuentran a menudo en agrupaciones y no están delimitados por septos (Blackwell, 1949). Los hinchamientos hifales son comunes en *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. megasperma* y *P. nicotianae*. La pared en muchos casos es menor de 0,5  $\mu\text{m}$  y similar a la pared miceliar (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las estructuras sexuales de *Phytophthora* son el anteridio (componente masculino) y el oogonio (componente femenino). El oogonio está delimitado de la hifa por un septo. La oospora se forma dentro del oogonio, es globosa y con doble pared (teóricamente triple, pero la epispora en *Phytophthora* es tan delgada que puede ser ignorada); la pared exterior es delgada mientras que la interior puede ser muy gruesa (Blackwell, 1949). La oospora diploide germina bajo condiciones favorables mediante la producción de uno o varios tubos germinativos en cuyos se extremos se puede dar o no la formación de un esporangio. Algunas especies de *Phytophthora* son homotáticas (auto-fértiles), en las cuales las estructuras sexuales se producen en un único cultivo, mientras que otras son heterotáticas (auto-estériles). En las especies heterotáticas, los aislados de apareamiento o tipos de complementación se designan como A1 y A2. Las oosporas de las especies heterotáticas se forman cuando están presentes los dos tipos de complementación A1 y A2 en un medio adecuado. La función de

las oosporas en las especies homotáticas es la persistencia de propágulos en el material vegetal infectado (Slusher *et al.*, 1974; Stack y Millar, 1985). El papel de las oosporas en tipos heterotáticos aún no se conoce con exactitud, pero hay evidencias de que el cruzamiento entre A1 y A2 puede dar lugar a nuevas razas o biotipos (Erwin y Ribeiro, 1996).

#### 1.1.3.1.2.1.1. *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan

*Phytophthora nicotianae* posee unas características morfológicas propias que le diferencian del resto de especies del género *Phytophthora*. El crecimiento de las colonias de *P. nicotianae* en medio PDA es de tipo aracnoide, las hifas presentan paredes irregulares, de aspecto coraloide y con hinchamientos hifales, es frecuente la formación de clamidosporas tanto terminales como intercalares (Figura 1.5.A).

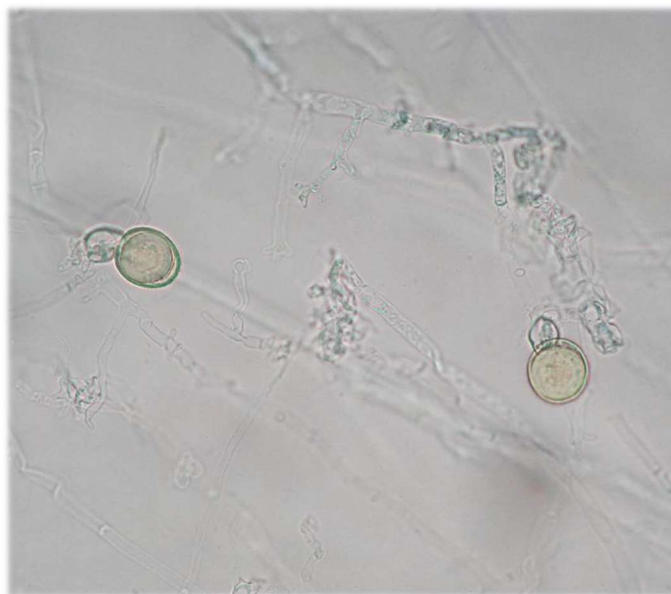


**Figura 1.5.A.** Micelio de *P. nicotianae* teñido con azul de lactofenol con hifas de paredes irregulares de aspecto coraloide, con hinchamientos hifales y clamidosporas (Recuperada de Picón-Toro, 2011). **B.** Esporangios de *P. nicotianae* al microscopio óptico teñidos de azul de lactofenol (Recuperada de Picón-Toro, 2011).

Los esporangios son terminales no caducos, con forma subesférica –ovoide, con papilas prominentes, generalmente unipapilados y en ocasiones bipapilados (Figura 1.5.B).

Los oogonios no son ornamentados (Figura 1.6) y es característico en *P. nicotianae* la posición anfigina del anteridio respecto al oogonio.





**Figura 1.6.** Imagen al microscopio óptico de las estructuras sexuales de *P. nicotianae*: oogonio y anteridio en posición anfigina (Recuperada de Picón-Toro, 2011).

*P. nicotianae* es una especie que puede ser patógena para un gran número de especies vegetales y es capaz de persistir en el suelo en forma de clamidosporas y oosporas en la ausencia de condiciones favorables y de un hospedador susceptible (Erwin y Ribeiro, 1996). Es una de las especies fitopatógenas de suelo más ampliamente distribuida y destructiva (Erwin y Ribeiro, 1996) y es responsable de grandes pérdidas en un elevado número de plantas hospedadoras (Panabières *et al.*, 2016).

Pérez (2011) estudió 27 aislados de *Phytophthora* procedentes de plantas de pimiento de varias procedencias (Almería, País Vasco y la mayoría de Murcia), de los cuales 7 eran de *P. capsici* y el resto de *P. nicotianae*. Guerrero (2012) caracterizó las poblaciones de *Phytophthora* spp. (70 aislados) de los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena, perteneciendo la mayoría de los aislados a *P. nicotianae*. Rodríguez-Molina *et al.* (2010b) y Morales-Rodríguez (2011) caracterizaron 27 aislados de *P. nicotianae* procedentes de plantas de pimiento enfermas cultivadas en los valles del Tiétar y el Alagón (Cáceres), y todos ellos fueron heterotálicos y del tipo de compatibilidad A2, lo que sugiere que la principal estructura de conservación del patógeno en esta zona son las clamidosporas.

### **1.1.3.2. La fusariosis vascular del tabaco**

La fusariosis vascular del tabaco está extendida en regiones productoras de tabaco y puede causar significantes pérdidas en la producción y calidad del cultivo. El patógeno que produce esta enfermedad es bastante variable y afecta a varios hospedadores, asociados a formas especiales y razas de tabaco, batata o algodón (LaMondia, 2015). La fusariosis vascular puede convertirse en una de las enfermedades más graves del cultivo de tabaco, especialmente cuando se asocia a infecciones del nematodo *Globodera tabacum* (LaMondia y Taylor, 1987; LaMondia, 1992, 1995). En Europa, la fusariosis vascular del tabaco se ha descrito en Italia (Diana y Piccirillo, 1994), Grecia (Tjamos *et al.*, 2006) y España (Rodríguez-Molina *et al.*, 2007).

#### **1.1.3.2.1. El cultivo de tabaco en Extremadura**

La industria del tabaco constituye un sector muy relevante en España, tanto por la producción como por la transformación de la hoja de tabaco. Esta industria aporta a las arcas públicas más de 9.100 millones de euros anuales, el equivalente al 5 % del total de los ingresos tributarios (AFI *et al.*, 2017). España es el tercer productor de hoja de tabaco de Europa, con una cuota del 15 % sobre el total en 2016 (AFI *et al.*, 2017).

El cultivo de tabaco en España se concentra en Extremadura, con una superficie que representa el 97 % sobre el total nacional, seguida de Andalucía (1,5 %) en el año 2016. En ese año, la producción española alcanzó 29.238 T, de las que 28.297 T corresponden a Extremadura (96,8 %) (MAPAMA). Según los datos de la Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio del Gobierno de Extremadura, en el año 2017 la superficie cultivada en Extremadura fue igual a 8.527 ha que produjeron 28.845 T de tabaco.

Las razones de índole técnica, vinculadas a la calidad agronómica de los suelos y de las aguas de riego, así como factores ambientales, de tradición y de concentración de las industrias receptoras, han motivado que el área geográfica

de producción de tabaco se localice mayoritariamente en la zona norte de Cáceres, con especial representatividad en los valles del Tiétar, Alagón y Árrago (Guzmán *et al.*, 2003). En estos valles se localizan tres comarcas que dependen crucialmente de las plantaciones de tabaco: Comarcas de Campo Arañuelo, la Vera y Alagón, que producen aproximadamente el 50 %, 35 % y 8 %, respectivamente, de la producción total nacional (AFI *et al.*, 2015). En el Valle del Tiétar se localiza la principal zona de producción, con una superficie aproximada de 8.700 ha de tabaco tipo Virginia y 1.400 ha de tipo Burley (Guzmán, 2010; Rodríguez-Molina *et al.*, 2013). El tabaco Virginia constituye el 96 % del total de la producción, seguido de las variedades Burley (3,3 %) y Havana (0,74 %) (OITAB, 2018). Hace aproximadamente 35 años, con el Plan de Reordenación del Sector Tabaquero del 82, se implantó la reconversión del Burley (tabaco negro) al Virginia (tabaco rubio). En consecuencia, fueron necesarias grandes inversiones para adaptarse a las necesidades de esta nueva variedad. A pesar de la importancia socioeconómica del cultivo de tabaco en Extremadura, a lo largo de estos años este se ha visto comprometido por varias razones: el recorte de las subvenciones de la Unión Europea, la promulgación de las “leyes antitabaco” que establecieron la prohibición general de fumar en espacios públicos y determinados espacios privados, la prohibición total del patrocinio y de la publicidad, las incertidumbres de los acuerdos de compra de tabaco por las multinacionales cada campaña, el comercio ilegal, las enfermedades del cultivo y la prohibición de numerosos pesticidas, y por último, una mayor regulación en el envasado, etiquetado e ingredientes (Directiva Europea sobre Productos del Tabaco (2014/40/UE).

Actualmente, España es el tercer productor de hoja de tabaco de la Unión Europea gracias al éxito de un modelo productivo que funciona con el compromiso de los agricultores, de la industria y de las instituciones de Extremadura (AFI *et al.*, 2017). El cultivo de tabaco es un sector estratégico para la región y el motor económico de las comarcas del norte de Cáceres, ya que genera un gran número de puestos de trabajo y miles de unidades familiares dependen de esta actividad (AFI *et al.*, 2017). Por otra parte, la Organización Interprofesional del Tabaco en



España (OITAB) ha resaltado la sostenibilidad del cultivo, consecuencia de la inversión en tecnología para lograr una producción de altísima calidad y respetuosa con el medio ambiente. Entre los años 2011 y 2015, los cultivadores de tabaco invirtieron más de 60 millones de euros en sus instalaciones de curado, con el fin de sustituir el empleo de combustibles fósiles por biomasa (AFI *et al.*, 2017). Además, la región extremeña se sitúa a la cabeza en materia de trazabilidad de la hoja de tabaco, regulada por el reciente Decreto 117/2018 para frenar el comercio ilegal y garantizar la procedencia y calidad del producto.

En la Orden de 2 de marzo de 2010, por la que se aprueba la Norma Técnica Específica de Producción Integrada de Tabaco, se especifican las prácticas de obligado cumplimiento para los operadores en las fases de producción, primera transformación y comercialización del tabaco en la Comunidad Autónoma de Extremadura. Esta Orden obliga a los productores al establecimiento de un programa de rotación de cultivo. En el Cuadro 1 de la Orden de 2 de marzo de 2010, se recogen las plagas/enfermedades que afectan al cultivo de tabaco, entre ellas, la fusariosis vascular del tabaco (*Fusarium oxysporum*) que puede aparecer en todas las fases del desarrollo del cultivo. Durante el cultivo de tabaco no se puede aplicar ningún tratamiento químico para combatir la fusariosis, por lo que es necesario utilizar diferentes técnicas para reducir la incidencia de esta enfermedad, como la rotación o la aplicación de fumigantes de suelo antes del establecimiento del cultivo. Bennett *et al.* (2011) indicaron que los fumigantes de suelo más efectivos para el control de *F. oxysporum* fueron el bromuro de metilo y la cloropicrina, que actualmente están prohibidos. Ante la necesidad de desinfectar los suelos para evitar pérdidas en la producción, la Comunidad Autónoma de Extremadura amparándose en el art. 53 del Reglamento 1107/2009 ha solicitado la autorización excepcional para el uso y comercialización de productos a base de 1,3 dicloropropeno para la desinfección del suelo en el cultivo de tabaco desde el 1 de marzo al 28 de mayo de 2019 (Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas agrarias y Territorio).

### 1.1.3.2.2. Síntomas de la fusariosis vascular del tabaco y agente causal

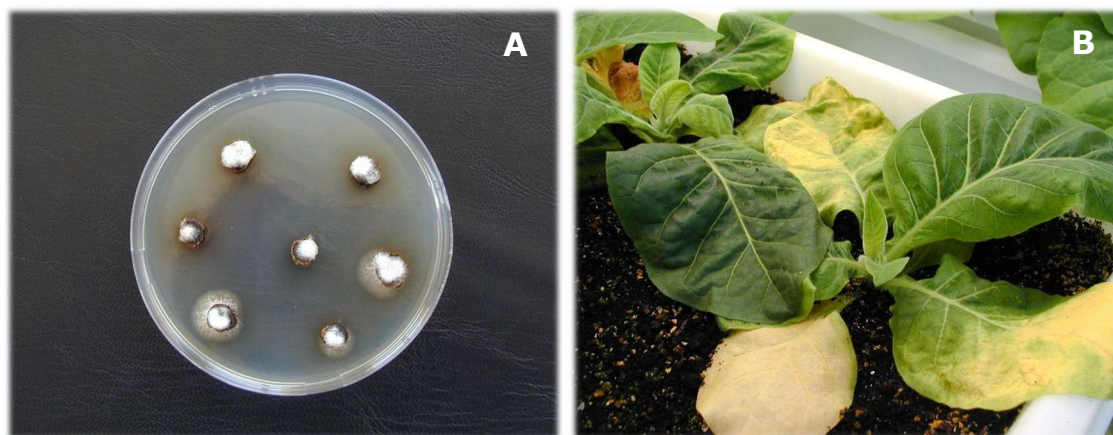
Los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* han constituido durante mucho tiempo uno de los principales problemas fitopatológicos asociados al cultivo de tabaco en el valle del Tiétar (Espárrago, 1999; Navas *et al.*, 2001). En el año 2001 se detectaron por primera vez poblaciones de nematodos formadores de quistes del complejo *Globodera tabacum* asociados a síntomas característicos de fusariosis vascular (Figura 1.7.A) en tabaco tipo Virginia (Espárrago y Blanco, 2002). Los nematodos formadores de nódulos, *Meloidogyne* spp., y los nematodos formadores de quistes, *G. tabacum*, incrementan la severidad de la fusariosis vascular del tabaco al incrementar los lugares de infección para el hongo en las zonas dañadas por los nematodos (LaMondia y Taylor, 1987; LaMondia, 1992).



**Figura 1.7.** **A.** Parcela de tabaco afectada por fusariosis vascular (Recuperado de Rodríguez-Molina *et al.*, 2009). **B.** Planta de tabaco con síntomas de la fusariosis vascular: hojas pequeñas y amarillentas, deformes, con nervios principales curvados (Recuperado de Picón-Toro, 2011).

Los síntomas observados en las plantas (Figura 1.7.B) fueron: marchitamiento, amarilleamiento y secado de las hojas unilateralmente; hojas enanas y deformadas con nervios centrales curvados; necrosis vasculares en tallos y peciolo de las hojas (Rodríguez-Molina *et al.*, 2007). Del sistema vascular de las plantas enfermas se obtuvieron aislados de *F. oxysporum* (Figura 1.8.A), que tras ser inoculados con la variedad sensible Ct-681 reprodujeron los síntomas

observados en las plantas enfermas (Figura 1.8.B) (Espárrago *et al.*, 2004; Rodríguez-Molina *et al.*, 2007).



**Figura 1.8.** **A.** Placa de PDA sembrada con fragmentos de peciolo de hojas de tabaco enfermas de fusariosis vascular (Recuperado de Picón-Toro, 2011). **B.** Plantas de tabaco de la variedad Ct-681 inoculadas con *F. oxysporum* aislado de una planta de tabaco afectada por fusariosis vascular (Recuperado de Picón-Toro, 2011).

La fusariosis vascular del tabaco puede ser causada por *F. oxysporum* f. sp. *nicotianae*, *F. oxysporum* f. sp. *vasiinfectedum* o *F. oxysporum* f. sp. *batatas* (Smith y Shaw, 1943; Armstrong y Armstrong, 1968). Armstrong y Armstrong (1968) excluyeron a *F. oxysporum* f. sp. *nicotianae* de la lista de las formas especializadas de *F. oxysporum* al no encontrar aislados específicos para el tabaco. En Japón se ha descrito una nueva especie, *Fusarium kyushuense* (Aoki y O'Donnell, 1998), que causa fusariosis vascular del tabaco en China (Wang *et al.*, 2013). Rodríguez-Molina *et al.* (2007) después de realizar inoculaciones en los hospedadores diferenciales (algodón (*Gossypium hirsutum* L. var. Acala, batatas (*Ipomoea batatas*) y tabaco Burley y Virginia), identificaron a *F. oxysporum* f. sp. *batatas* como agente causal de la fusariosis vascular del tabaco en Extremadura. Posteriormente, Rodríguez-Molina *et al.* (2013) comunicaron el hallazgo de la existencia de las razas 1 y 2 de *F. oxysporum* f. sp. *batatas* en Extremadura. Estos autores caracterizaron 40 aislados, procedentes del suelo y de plantas enfermas procedentes de campos de cultivo de tabaco, mediante estudios de patogenicidad, grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). El análisis de patogenicidad permitió clasificar los aislados en dos razas. La raza 1 incluye aislados de tabaco

Burley, patógenos para tabaco, batata y algodón; y a la raza 2 pertenecen los aislados de tabaco Virginia patógenos solo para tabaco Virginia. Los análisis de VCG y RAPD diferenciaron claramente los aislados de la raza 1 de los de la raza 2, sugiriendo que las dos razas de *F. oxysporum* f. sp. *batatas* en Extremadura podrían tener distintos orígenes y pertenecer a dos linajes diferentes.

#### **1.1.3.2.2.1. Género *Fusarium* Link**

Desde la VII edición del *Dictionary of the Fungi* (Hawksworth *et al.*, 1995) y hasta la actualidad, el género *Fusarium* se encuentra situado taxonómicamente en el reino *Fungi*, dentro del filo *Deuteromycota*, clase *Hyphomycetes*, orden *Moniliales*, familia *Tuberculariaceae*. El filo *Deuteromycota* incluye a hongos en fase asexual o con fase sexual desconocida.

El género *Fusarium* engloba a aquellas especies que producen conidias pluricelulares en forma de huso, de hoz y/o de cruasán (Messiaen y Cassini, 1968). Las formas sexuales, cuando se encuentran, se incluyen dentro del orden *Hypocreales*.

El carácter fundamental en la taxonomía de *Fusarium* es la forma de las macroconidias, aunque también se consideran otras características en la diferenciación de especies, como la presencia/ausencia de microconidias y su forma, la presencia/ausencia de clamidosporas y las características de las células conidiógenas.

Las conidias están dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios o masas limosas (pionnotes). Las células conidiógenas en *Fusarium* pueden ser de dos tipos: monofiálicas o polifiálicas. Las monofiálicas tienen un único poro por el que se liberan las endoconidias, mientras que las polifiálicas presentan varios poros de salida (Booth, 1971). Las especies de *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporas: macroconidias, microconidias y clamidosporas. Las macroconidias son curvadas, pluriseptadas, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie, y se

pueden producir en monofiálidas y polifiálidas en el micelio aéreo, pero también en monofiálidas cortas agrupadas en estructuras especializadas denominadas esporodoquios. Las microconidias pueden variar en forma (elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos) y tamaño, se producen en el micelio aéreo, ya sea en grupos o en cadenas, y se pueden originar tanto en monofiálidas como en polifiálidas. Finalmente, las clamidosporas son estructuras de resistencia con paredes engrosadas y alto contenido lipídico; en el caso de estar presentes, pueden ser intercalares o terminales. Algunas especies forman esclerocios irregulares, de color beige, ocre, pardo o gris oscuro.

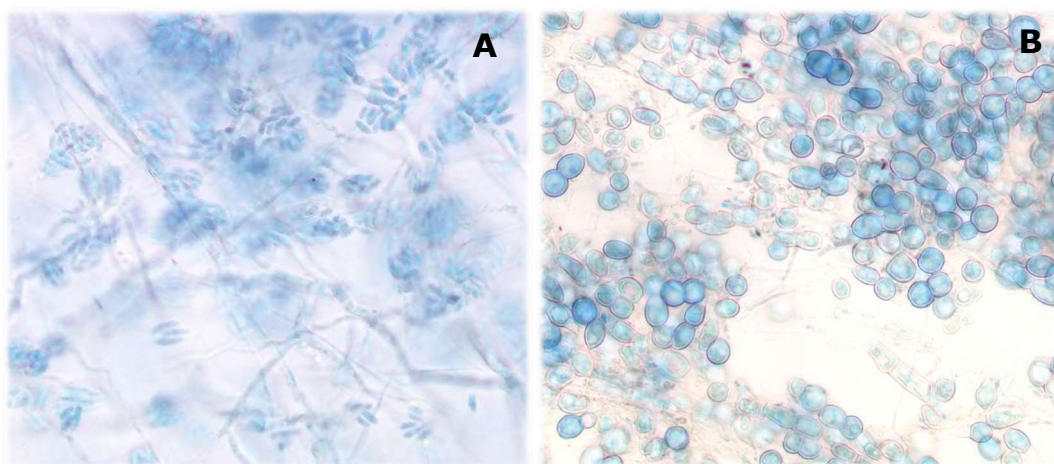
Las colonias pueden tener varios colores: blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, como un fieltro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso (Burgess *et al.*, 1994; Leslie y Summerell, 2006).

*Fusarium* constituye un género amplio y complejo de hongos causantes de una gran variedad de enfermedades en plantas, produce numerosas micotoxinas y se está convirtiendo en un importante patógeno humano (Jiménez-Fernández, 2011). Las especies de *Fusarium* se encuentran distribuidas por todo el mundo (Nelson, 1990). La mayoría de ellas se encuentran normalmente en el suelo, ya sea como parásitos de plantas o como saprófitos, aunque también hay especies que son capaces de colonizar las partes aéreas de las plantas (Burgess, 1981). *Fusarium* es uno de los géneros de hongos fitopatógenos más incidentes y devastadores de cultivos en el planeta en los últimos años (Villa-Martínez *et al.*, 2015), incluye especies patógenas de plantas de gran importancia económica, que ocasionan enfermedades caracterizadas por la aparición de marchitez, tizones, pudriciones en cultivos ornamentales y forestales en ecosistemas agrícolas y naturales (Ma *et al.*, 2013). *Fusarium* comprende al menos 300 especies filogenéticas genealógicamente exclusivas. Las especies patógenas de plantas se incluyen en cuatro grupos principales: *Fusarium fujikuroi* especies complex, *Fusarium graminearum* especies complex, *Fusarium solani* especies complex y *Fusarium oxysporum* especies complex (Aoki *et al.*, 2014).



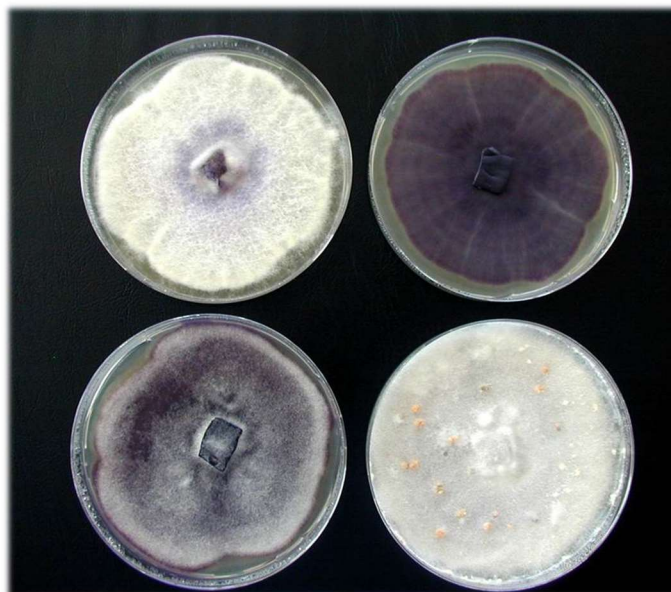
#### 1.1.3.2.2.1.1. *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyder y Hans.

*Fusarium oxysporum* representa un complejo muy diverso de hongos anamórficos morfológicamente similares con múltiples orígenes filogenéticos (Jiménez-Fernández, 2011). Las evidencias filogenéticas sugieren que *F. oxysporum* es un complejo de múltiples especies morfológicamente crípticas, conocido como el complejo de especies de *F. oxysporum* “*Fusarium oxysporum* species complex” (FOSC) (Laurence *et al.*, 2014) e incluye cepas patógenas y no patógenas. Los aislados patógenos se dividen en *formae speciales* basados en la especificidad del hospedador, hay más de 70 f. sp. descritas (Armstrong y Armstrong, 1981). *Fusarium oxysporum* es la especie del género *Fusarium* más importante desde el punto de vista fitopatológico, ya que en ella se incluyen la mayoría de las especializaciones que originan las Fusariosis Vasculares (Tello y Lacasa, 1990). El amplio inventario de formas especializadas de *F. oxysporum* causantes de enfermedades vasculares es un indicador de la profundidad con que se ha estudiado la relación hospedador-patógeno en las enfermedades que causan a los cultivos las especies de este género (Rodríguez-Molina, 1996).



**Figura 1.9.** **A.** Microconidias de *F. oxysporum* al microscopio óptico teñidas con azul de lactofenol (Recuperado de Picón-Toro, 2011). **B.** Clamidosporas de *F. oxysporum* al microscopio óptico teñidas con azul de lactofenol (Recuperado de Picón-Toro, 2011).

Las características que diferencian a la especie *F. oxysporum* son las macroconidias solo ligeramente curvadas, con una célula apical atenuada y célula basal en forma de pie; microconidias abundantes formadas en falsas cabezas en monofiálicas cortas (Figura 1.9.A); la presencia de clamidosporas aisladas o en parejas (Figura 1.9.B); crecimiento rápido en PDA y micelio aéreo blanco que se puede teñir de color púrpura (Figura 1.10), y el micelio sumergido puede ser desde incoloro a azul oscuro o púrpura (Nelson *et al.*, 1983).



**Figura 1.10.** Placas de medio PDA con colonias de aislados de *Fusarium oxysporum* (Recuperado de Picón-Toro, 2011).

## 1.2. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar, en condiciones de laboratorio y campo, la efectividad de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización en el control de patógenos edáficos (*Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum*) en los cultivos de pimiento para pimentón y tabaco en Extremadura; como alternativas al uso de desinfectantes químicos y adecuadas a las condiciones edafoclimáticas de esta comunidad. Asimismo, estudiar el efecto de estas técnicas en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y en la producción del cultivo.





## Capítulo 2



**Evaluación en condiciones de laboratorio de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización para el control de *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum***



## 2.1. Introducción

Numerosos estudios han demostrado el efecto tóxico de los ITCs contenidos en tejidos de las especies de *Brassicaceae*, en la inhibición del crecimiento micelial y en la inactivación de estructuras de resistencia, como clamidosporas, oosporas o esclerocios de diferentes especies de hongos.

El tipo y la concentración de los GSLs, precursores de los ITCs, varían entre las especies de crucíferas y entre los tejidos de estas. La distribución de GSLs ha sido estudiada en varios órganos de las plantas, tanto cuantitativamente como cualitativamente, mostrando diferencias entre raíces, hojas, tallos y semillas (Fahey *et al.*, 2001) Mattner *et al.* (2008) observaron que de las raíces de *B. napus* y *B. rapa* se liberaba una mayor concentración y una mayor diversidad de ITCs que de los tallos. Los resultados de un amplio estudio realizado por Kirkegaard y Sarwar (1998) con 76 líneas de 13 especies de *Brassica* y otras especies relacionadas indican que los tallos contienen predominantemente GSLs alifáticos, mientras que en las raíces predominan los aromáticos. Varios autores, como Drobnica *et al.* (1967) y Kirkegaard *et al.* (1999) demostraron la existencia de diferencias de toxicidad entre los GSLs aromáticos y alifáticos.

La temperatura es un factor importante que afecta a la volatilidad y a la concentración en la atmósfera del suelo de los ITCs producidos durante la hidrólisis de los GSLs (Price *et al.*, 2005). Gamliel y Stapleton (1993) encontraron diferencias cuantitativas y cualitativas entre los compuestos volátiles liberados en suelos biofumigados con col y sometidos a temperaturas elevadas y los biofumigados y mantenidos a 25 °C, así como en el efecto de estos compuestos en la viabilidad de los propágulos de *Pythium ultimum* y *Sclerotium rolfsii*. Ramírez-Villapudua y Munnecke (1987) demostraron que la biofumigación con residuos secos de *B. oleracea* var. *capitata* con solarización era más eficaz en el control de la enfermedad causada por *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* en col que cualquiera de los dos sistemas de control por separado. Rodríguez-Molina *et al.* (2010a) demostraron también la influencia de la temperatura del suelo en la

eficacia de la biofumigación con diferentes especies de *Brassicaceae* en ensayos en condiciones controladas de laboratorio.

En realidad, poco se conoce sobre la relación entre la temperatura y los tipos y cantidades de ITCs liberados por los tejidos de *Brassicaceae* y, por tanto, entre la temperatura y la eficacia de estos tejidos en la inactivación de los hongos fitopatógenos.

## 2.2. Objetivo

El objetivo principal de este capítulo fue evaluar la susceptibilidad de diferentes estructuras fúngicas de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* a la toxicidad de los productos liberados por varias especies de *Brassicaceae*. Además, estudiar los factores que influyen en la respuesta de los hongos frente a estos compuestos tóxicos, como el tipo de material biofumigante (fresco, pellets y harina de semilla), temperatura y tiempo de exposición. Este objetivo general se concretó en dos objetivos más específicos:

- Estudiar las diferencias en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, por compuestos liberados por las partes aérea y subterránea de varias especies de *Brassicaceae*, pellets de *B. carinata* (BioFence®) y torta de colza.
- Evaluar la inactivación de distintos tipos de inóculo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* por el efecto de los productos liberados por especies de *Brassicaceae* en fresco y pellets de *B. carinata* (BioFence®) combinados con diferentes condiciones de temperatura (constante o fluctuante).

## 2.3. Inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum*

Con la realización de este ensayo se quería comprobar si las especies de *Brassicaceae* elegidas por su alto potencial biofumigante, según Kirkegaard y

Sarwar (1998), eran capaces de inhibir el crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, de cara a utilizar estas mismas especies en el ensayo de campo. Al mismo tiempo, se probaba si existían muchas diferencias de inhibición según la parte de la planta empleada con el objetivo de utilizar las especies que causaran mayor inhibición para ambas partes.

### **2.3.1. Efecto de la especie de *Brassicaceae* y parte de la planta empleada como biofumigante**

#### **2.3.1.1. Material y métodos**

Para evaluar la susceptibilidad de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* a los compuestos biofumigantes liberados por la parte aérea y subterránea de distintas crucíferas, se determinó la inhibición del crecimiento micelial de aislados de estas dos especies fúngicas. Se estudió la influencia de varios factores: la especie de hongo fitopatógeno, la parte de la planta utilizada y la especie de *Brassicaceae*.

##### **2.3.1.1.1. Material biofumigante**

Como material biofumigante se emplearon las especies *Brassica nigra* L. (mostaza negra), *Sinapis alba* L. (mostaza blanca), *Brassica oleracea* L. var. *italica* (brócoli), *Brassica napus* L. var. *oleifera* (colza de primavera) y *Capsella bursa-pastoris* Moench. (bolsa de pastor). Se ensayó la parte aérea (tallo, hojas, flores y silícuas) y la parte subterránea (raíces) de las plantas de todas las especies menos de *C. bursa-pastoris*, de la que solo se ensayó la parte aérea. Las especies ensayadas se cultivaron en parcelas de la Finca La Orden desde octubre de 2010 a marzo-abril de 2011 (Figura 2.1), excepto *C. bursa-pastoris* que se presentó como mala hierba en parcelas sin cultivo.





**Figura 2.1.** Cultivo de *B. nigra* en la Finca La Orden (Recuperado de Picón-Toro, 2011).

Bellostas *et al.* (2004) afirmaron que en *B. nigra*, *B. carinata*, *B. juncea* y *B. rapa* la mayor concentración de GSLs se encontraba en los órganos reproductivos comparada con las partes vegetativas, sugiriendo que el aprovechamiento óptimo como biofumigantes sería cuando se encontraran en las fases más tardías del crecimiento. En base a estas afirmaciones, las plantas utilizadas en el ensayo se recogieron al final del periodo de crecimiento.

El estado fenológico de las plantas fue, según las claves de Berkenkamp (1973): 3.3 (las silicuas inferiores de los racimos empezándose a llenar) en *B. nigra* y 3.4 - 4.0 (todos los botones florales abiertos y engorde de semillas - semillas en las vainas inferiores de los racimos completamente llenas, transparentes) para el resto de las especies. En relación a *B. oleracea*, el estado en el que se utilizó la planta fue el de la recolección comercial.

#### **2.3.1.1.2. Material fúngico**

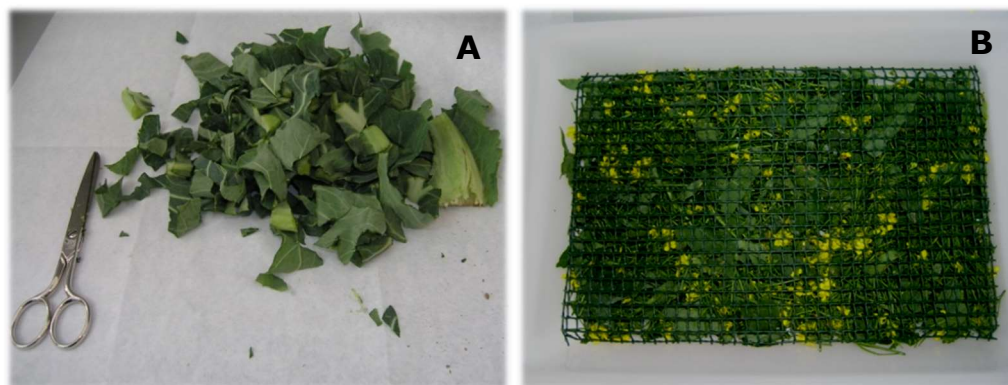
El material fúngico utilizado fueron 12 aislados:

- 6 aislados de *P. nicotianae*: 3 procedentes de plantas de pimiento de los valles del Tiétar y el Alagón (P13, P23 y P32) y 3 procedentes de plantas de tomate de las Vegas del Guadiana (T3, T6 y T8).
- 6 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *batatas* procedentes de plantas de tabaco del valle del Tiétar (Fo-12, F1-B4, F2-C3, F4-A1, F4-B2 y F4-C4).

Cada uno de los aislados se desarrolló en medio PDA (Patata Dextrosa Agar) durante 7-10 días. Se tomó una pastilla de 4 mm de diámetro del borde de cada colonia, disponiéndose en una nueva placa de Petri (55 mm de diámetro) con 7,5 ml de PDA. Todas las placas fueron incubadas durante 24 h a 25 °C y transferidas, pasado este tiempo, a bandejas de plástico de 55 x 35 x 8 cm (largo x ancho x alto) con las partes aérea y subterránea de cada una de las especies biofumigantes, de acuerdo a la metodología propuesta por Morales-Rodríguez *et al.* (2010).

#### **2.3.1.1.3. Medida de la inhibición del crecimiento micelar**

Las plantas se recogieron el mismo día del ensayo, separándose la parte aérea de la subterránea. Las raíces se lavaron con agua para eliminar la tierra de la rizosfera y a continuación, se secaron sobre papel de filtro. Se trocearon por separado las dos partes de la planta (Figura 2.2.A) y en cada bandeja se dispusieron 320 g del material a ensayar, de manera que el material vegetal formara una capa uniforme cubriendo toda la base de la bandeja. Sobre esta capa vegetal se colocó una rejilla de plástico (Figura 2.2.B) con el fin de que los fragmentos vegetales no estuviesen en contacto directo con las placas de medio PDA, evitándose así posibles contaminaciones. Tanto las bandejas como las rejillas se expusieron a luz ultravioleta durante 15 minutos antes de su utilización.



**Figura 2.2.A.** Triturado de *B. oleracea* (Recuperado de Picón-Toro, 2011). **B.** Triturado de *B. nigra* dispuesto en la bandeja, encima se colocó una rejilla de plástico para minimizar el riesgo de contaminaciones (Recuperado de Picón-Toro, 2011).

Sobre estas rejillas se dispusieron las placas de Petri con el disco de siembra y sin tapadera. Para evitar el escape de los compuestos volátiles desprendidos de los tejidos, las bandejas se sellaron con plástico. Con el fin de impedir la desecación del biofumigante, así como del medio de cultivo, se introdujeron en cada una de las bandejas tiras de papel humedecido. En el caso de los testigos, en lugar del material vegetal se colocó en la base de la bandeja papel de filtro humedecido con agua destilada. Las bandejas se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad. El diámetro de las colonias se midió a las 72 h, tomándose dos medidas de diámetro perpendiculares de cada una de las placas. Para calcular el porcentaje de inhibición, el crecimiento radial se expresó como porcentaje de la media del crecimiento del testigo.

Se estudió el efecto de la parte aérea y subterránea (cuello y raíces) de las especies de *B. nigra*, *S. alba*, *B. oleracea* y *B. napus* y también el efecto de la parte aérea de *C. bursa-pastoris* en la inhibición del crecimiento de las dos especies de hongos (*P. nicotianae* y *F. oxysporum*). Se realizaron 3 repeticiones por cada parte de la planta y especie de *Brassicaceae* y 3 repeticiones de testigo por cada especie biofumigante.

### **2.3.1.2. Análisis estadístico**

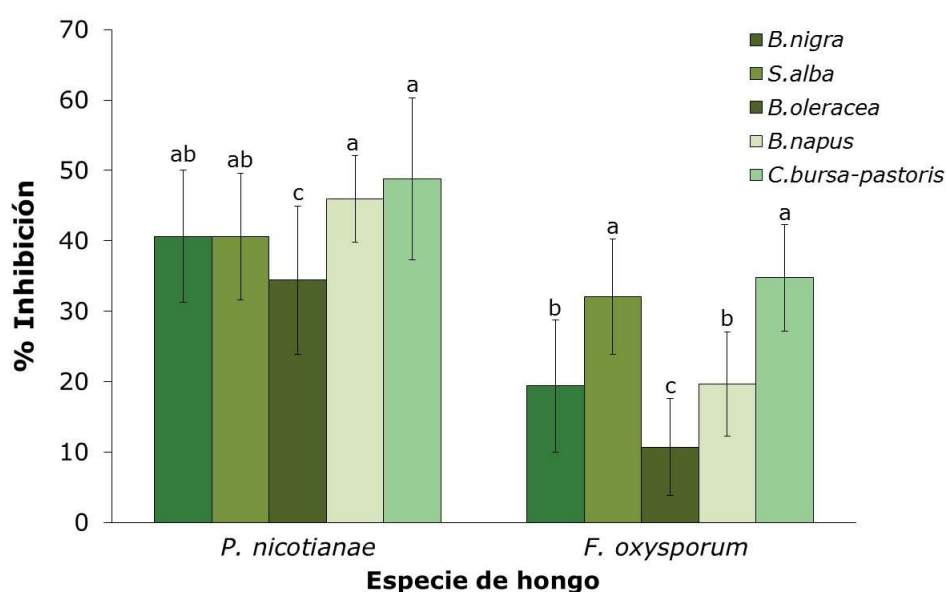


Para el análisis estadístico los datos se expresaron en tanto por uno, realizándose la transformación "arcoseno" para cumplir los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Sokal y Rohlf, 1995). Posteriormente, los datos se analizaron mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey para la determinación de grupos homogéneos. Para la realización de los análisis se utilizó el programa estadístico R versión 3.5.1 (R Development Core Team, 2018).

### 2.3.1.3. Resultados

#### 2.3.1.3.1. Efecto de la especie de *Brassicaceae* (parte aérea) en la inhibición del crecimiento micelial

Las cinco especies de *Brassicaceae* inhibieron el crecimiento micelial de *P. nicotianae* y de *F. oxysporum*. En la Figura 2.3 se presenta el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial que produjo cada especie de *Brassicaceae* en cada especie de hongo.



**Figura 2.3.** Inhibición del crecimiento micelial (%  $\pm$  desviación estándar) producido por el efecto de la parte aérea de cada una de las especies biofumigantes para las dos especies de hongos. Para cada especie de hongo, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P > 0,05$ ).

Los resultados del análisis de la varianza con dos factores fijos (especie de hongo y biofumigante) se presentan en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Efecto de la especie de hongo (E), biofumigante (B) y la interacción especie de hongo x biofumigante (ExB) en la inhibición del crecimiento micelial. ANOVA con dos factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Especie de hongo (E)	1,80	1	1,80	199,74	0,00
Biofumigante (B)	0,83	4	0,21	23,13	0,00
ExB	0,20	4	0,05	5,57	0,00
Residuos	1,52	169	0,01		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

La inhibición del crecimiento micelial difirió significativamente entre especies de hongos y entre biofumigantes y fue significativa la interacción especie de hongo x biofumigante. Se realizaron ANOVAs con un factor fijo (especie de hongo) para cada biofumigante, y los resultados se muestran en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Efecto de la especie de hongo (E) en la inhibición del crecimiento micelial para cada una de las especies biofumigantes. ANOVAs con un factor fijo.

Biofumigante	Fuente	SC	gl	CM	F	P
<i>B. nigra</i>	Especie (E)	0,44	1	0,44	43,91	0,00
	Residuos	0,33	33	0,01		
<i>S. alba</i>	Especie (E)	0,08	1	0,08	8,81	0,00
	Residuos	0,3	34	0,00		
<i>B. oleracea</i>	Especie (E)	0,54	1	0,54	63,01	0,00
	Residuos	0,29	34	0,00		
<i>B. napus</i>	Especie (E)	0,7	1	0,70	132,3	0,00
	Residuos	0,18	34	0,00		
<i>C. bursa-pastoris</i>	Especie (E)	0,23	1	0,23	18,43	0,00
	Residuos	0,42	34	0,01		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Los resultados de los ANOVAs indicaron que para cada una de las especies biofumigantes estudiadas fueron significativas ( $P < 0,05$ ) las diferencias entre las especies de hongos, en todas ellas *P. nicotianae* presentó un porcentaje de inhibición significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor que *F. oxysporum*.

Para el estudio del efecto de la especie biofumigante se realizaron ANOVAs con un factor fijo (biofumigante) para cada especie de hongo. El efecto del biofumigante fue significativo tanto para *P. nicotianae* ( $F=6,08$ ;  $P<0,05$ ) como para *F. oxysporum* ( $F=28,03$ ;  $P<0,05$ ), por ello, se realizó un test de comparación de medias de Tukey para cada especie. En las dos especies de hongos se diferenciaron significativamente ( $P<0,05$ ) varios grupos homogéneos (Figura 2.3). En *P. nicotianae* las especies biofumigantes que presentaron mayor porcentaje de inhibición fueron *C. bursa-pastoris* y *B. napus*, y la que menos *B. oleracea*. Sin embargo, en el caso de *F. oxysporum*, fueron las especies *C. bursa-pastoris* y *S. alba* las que más inhibieron y *B. oleracea* la especie que inhibió menos, como en *P. nicotianae*.

### 2.3.1.3.2. Efecto de la parte de la planta empleada y de la especie de *Brassicaceae* en la inhibición del crecimiento miceliar

Tanto la parte aérea como la subterránea de las cuatro especies ensayadas inhibieron el crecimiento miceliar de *P. nicotianae* y de *F. oxysporum*. Los resultados del análisis de la varianza con tres factores fijos (especie de hongo, especie biofumigante y parte de la planta) se presentan en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.** Efecto de la especie de hongo (E), biofumigante (B), parte de la planta empleada (P) y las interacciones especie de hongo x biofumigante (ExB), especie de hongo x parte de la planta (ExP), biofumigante x parte de la planta (BxP) y especie de hongo x biofumigante x parte de la planta (ExBxP) en la inhibición del crecimiento miceliar. ANOVA con tres factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Especie de hongo (E)	5,00	1	5,00	582,89	0,00
Biofumigante (B)	0,43	3	0,14	16,75	0,00
Parte de la planta (P)	0,66	1	0,66	76,52	0,00
ExB	0,15	3	0,05	5,66	0,00
ExP	0,22	1	0,22	25,15	0,00
BxP	0,12	3	0,04	4,60	0,00
ExBxP	0,08	3	0,03	2,96	0,03
Residuos	2,31	269	0,00		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

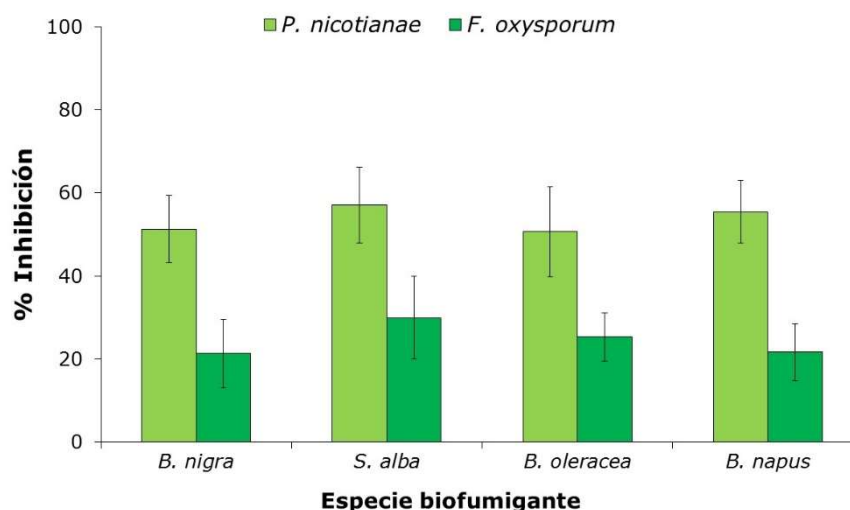
La inhibición del crecimiento micelial difirió significativamente entre especies de hongos, biofumigantes y partes de la planta, y fueron significativas todas las interacciones estudiadas. La interacción especie de hongo x parte de la planta fue significativa ( $P < 0,05$ ) y para estudiar las diferencias de susceptibilidad a la parte subterránea de la planta según la especie de hongo, se realizaron ANOVAs con un factor fijo (especie de hongo) para cada biofumigante. Los resultados se muestran en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4.** Efecto de la especie de hongo (E) en la inhibición del crecimiento micelial para la parte subterránea de las diferentes especies biofumigantes. ANOVAs con 1 factor fijo.

Biofumigante	Fuente	SC	gl	CM	F	P
<i>B. nigra</i>	Especie (E)	0,90	1	0,90	109,03	0,00
	Residuos	0,26	32	0,01		
<i>S. alba</i>	Especie (E)	0,84	1	0,84	73,86	0,00
	Residuos	0,39	34	0,01		
<i>B. oleracea</i>	Especie (E)	0,70	1	0,70	74,41	0,00
	Residuos	0,32	34	0,01		
<i>B. napus</i>	Especie (E)	1,24	1	1,24	182,04	0,00
	Residuos	0,23	34	0,01		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Los resultados de los ANOVAs indicaron que las dos especies de hongos difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) en susceptibilidad a cada una de las especies biofumigantes. La inhibición del crecimiento micelial en *P. nicotianae* fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor que en *F. oxysporum* para todos los biofumigantes (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Inhibición del crecimiento micelial (%  $\pm$  desviación estándar) de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* debido al efecto de la parte subterránea de las especies biofumigantes.

Para estudiar el efecto de la especie biofumigante y la parte de la planta en la inhibición del crecimiento de *P. nicotianae* y de *F. oxysporum* se realizaron ANOVAs con dos factores fijos (biofumigante y parte de la planta) para cada especie de hongo. Los resultados se presentan en la Tabla 2.5.

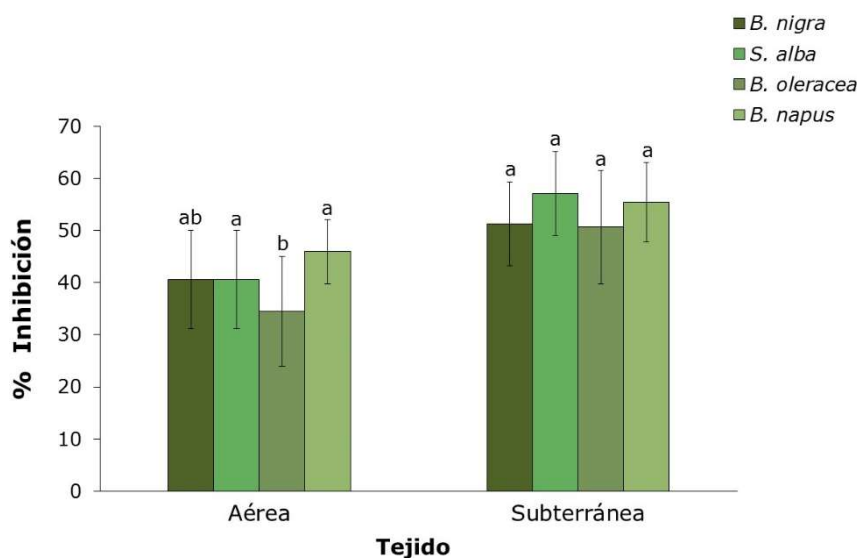
**Tabla 2.5.** Efecto del biofumigante (B), de la parte de la planta (P) y la interacción biofumigante x parte de la planta (BxP) en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. ANOVAs con dos factores fijos.

Especie de hongo	Fuente	SC	gl	CM	F	P
<i>P. nicotianae</i>	Biofumigante (B)	0,17	3	0,06	5,46	0,00
	Parte de planta (P)	0,81	1	0,81	78,05	0,00
	BxP	0,04	3	0,01	1,42	0,24
	Residuos	1,39	133	0,01		
<i>F. oxysporum</i>	Biofumigante (B)	0,39	3	0,13	19,15	0,00
	Parte de planta (P)	0,06	1	0,06	9,06	0,00
	BxP	0,15	3	0,05	7,27	0,00
	Residuos	0,92	136	0,00		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Para las dos especies de hongos la inhibición del crecimiento micelial difirió significativamente entre biofumigantes y parte de la planta, y la interacción biofumigante x parte de la planta fue significativa para *F. oxysporum*, pero no lo

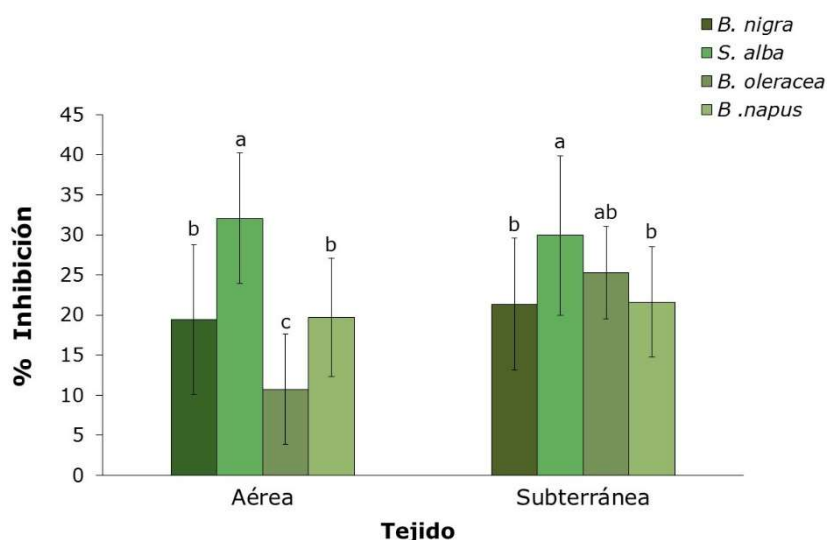
fue en el caso de *P. nicotianae*. El efecto de cada parte de la planta de las distintas especies biofumigantes en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* se presenta en la Figura 2.5. En esta especie el efecto de inhibición de la parte subterránea ( $53,7 \pm 9,3$  %) fue significativamente mayor que el de la parte aérea ( $40,4 \pm 9,7$  %). En la parte aérea, los biofumigantes se agruparon en varios grupos homogéneos, mientras que en la parte subterránea no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre biofumigantes.



**Figura 2.5.** Inhibición del crecimiento micelial (%  $\pm$  desviación estándar) de *P. nicotianae* debido al efecto de la parte aérea y de la subterránea de las especies biofumigantes. Para cada parte de la planta, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P > 0,05$ ).

Como en el caso de *F. oxysporum* la interacción biofumigante x parte de la planta fue significativa ( $P < 0,05$ ) se estudió por separado cada uno de los factores. Para ello se realizó un ANOVA con un factor fijo (biofumigante) para cada parte de la planta. Los resultados indican que hay diferencias significativas entre biofumigantes para la parte aérea ( $F=21,59$ ;  $P < 0,05$ ) y para la parte subterránea ( $F=3,71$ ,  $P < 0,05$ ). Se realizó un test de comparaciones múltiples de Tukey para cada parte de la planta empleada (Figura 2.6). La parte aérea que presentó mayor inhibición del crecimiento micelial fue la de la especie *S. alba* y la que menos la de *B. oleracea*, como ya se había observado en el apartado 2.3.1.3.1. Para la parte subterránea, *S. alba* fue la especie que más inhibió y, *B. nigra* y *B. napus* las que menos (Figura 2.6). Además, para cada especie

biofumigante se realizó un ANOVA con un factor fijo (parte de la planta empleada) y los resultados se presentan en la Tabla 2.6. Tan solo en el caso de *B. oleracea* las diferencias entre el porcentaje de inhibición de las dos partes de la planta fueron significativas ( $P < 0,05$ ), siendo mayor la inhibición causada por la parte subterránea ( $25,3 \pm 5,8 \%$ ) que la correspondiente a la parte aérea ( $10,7 \pm 6,9 \%$ ).



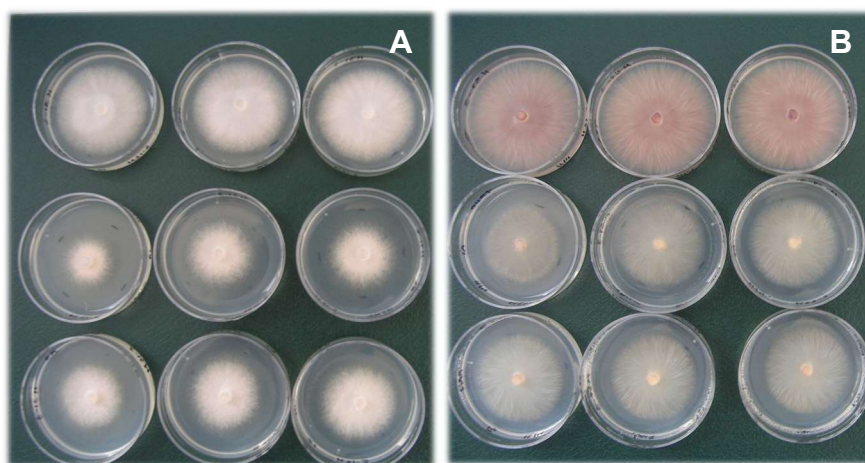
**Figura 2.6.** Inhibición del crecimiento micelial (%  $\pm$  desviación estándar) de *F. oxysporum* debido al efecto de la parte aérea y de la subterránea de las especies biofumigantes. Para cada parte de la planta, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P > 0,05$ ).

**Tabla 2.6.** Efecto de la parte de la planta (P) en la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* para las diferentes especies biofumigantes ensayadas. ANOVAs con 1 factor fijo.

Biofumigante	Fuente	SC	gl	CM	F	P
<i>B. nigra</i>	Parte de planta (P)	0,00	1	0,00	0,42	0,52
	Residuos	0,28	34	0,00		
<i>S. alba</i>	Parte de planta (P)	0,00	1	0,00	0,48	0,49
	Residuos	0,31	34	0,01		
<i>B. oleracea</i>	Parte de planta (P)	0,18	1	0,20	47,49	0,00
	Residuos	0,14	34	0,00		
<i>B. napus</i>	Parte de planta (P)	0,00	1	0,00	0,63	0,43
	Residuos	0,18	34	0,01		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

En las placas de *F. oxysporum* sometidas a los efectos de la parte aérea y subterránea de las especies biofumigantes se observaron cambios en la morfología de las colonias respecto a los testigos. El micelio fue denso en el centro de la pastilla y más laxo en los bordes de la colonia (Figura 2.7.A), también se observaron cambios en la coloración de las colonias (Figura 2.7.B).



**Figura 2.7.** Inhibición del crecimiento micelial de dos aislados de *F. oxysporum* con cambios en la densidad del micelio en los bordes de la colonia (**A**) y coloración (**B**) respecto a los testigos (1ª línea de placas) causados por la parte aérea (2ª línea de placas) y parte subterránea (3ª línea de placas) (Imágenes recuperadas de Picón-Toro, 2011).

#### 2.3.1.4. Discusión

Las especies de *Brassicaceae* ensayadas inhibieron el crecimiento micelial de los aislados de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*; pero este efecto inhibitorio resultó diferente según la especie de hongo estudiada, la parte de la planta empleada y la especie biofumigante. La inhibición del crecimiento micelial como resultado a la exposición a ITCs ha sido observada para una amplia variedad de hongos (Mari *et al.*, 1993; Angus *et al.*, 1994; Sarwar *et al.*, 1998). Se ha descrito la inhibición del crecimiento micelial por el uso de material fresco de crucíferas en *Aphanomyces euteiches* (Hossain *et al.*, 2014), *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* (Picón-Toro *et al.*, 2012b), *Phytophthora erythroseptica* (Larkin y Griffin, 2007), *Phytophthora cinnamomi* (Ríos *et al.*, 2012), *Phytophthora nicotianae*



(Morales-Rodríguez *et al.*, 2010, 2012; Picón-Toro *et al.*, 2012b), *Pythium ultimum* (Larkin y Griffin, 2007).

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos muestran que *P. nicotianae* es más susceptible que *F. oxysporum* al efecto biofumigante de todas las especies de *Brassicaceae* ensayadas, tanto a la parte aérea de las plantas como a la subterránea. Esta situación coincide con lo descrito por otros autores. Mattner *et al.* (2008) encontraron que altas dosis de biofumigante fueron letales para *Alternaria alternata*, *Colletotrichum dematium*, *Cylindrocarpon destructans*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cactorum* y *Rhizoctonia fragariae* pero no lo fueron a *F. oxysporum*, aunque su crecimiento se inhibió en torno al 60 %. En un estudio realizado por Smolinska *et al.* (2003) con aislados de *F. oxysporum* se describen inhibiciones del crecimiento micelial relativamente bajas, lo que sugiere que el micelio representa una fase muy resistente en el ciclo de vida de este hongo.

Las diferencias en susceptibilidad entre las dos especies de hongos estudiadas no solo se ponen de manifiesto en los diferentes porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, sino también en el diferente efecto de los biofumigantes en la morfología de las colonias. En los aislados de *P. nicotianae* no se observaron cambios en la morfología de las colonias en presencia de los biofumigantes, mientras que en el caso *F. oxysporum* el micelio de los aislados expuestos a los biofumigantes se desarrolló de forma diferente al de los testigos, de manera que los distintos productos liberados por las partes aérea y subterránea de las plantas provocaron cambios en el color y en la densidad del micelio. Kirkegaard *et al.* (1996) también observaron cambios de color de las colonias de *Fusarium* spp. cuando se exponen a los compuestos liberados por *B. napus*. Estos hechos también se han descrito en otras especies de hongos, así, en presencia de altas concentraciones de ITCs las colonias de *B. sorokiniana* cambiaron de color, pasando de negro a blanco, mientras que en *P. irregulare* se observó una reducción en la densidad y ramificación de las hifas del micelio, aunque no hubo diferencias en el diámetro de la colonia (Sarwar *et al.*, 1998).

Las diferencias en la sensibilidad de las especies de hongos frente a ITCs puros han sido revisados por Fenwick *et al.* (1983), Brown y Morra (1997) y Rosa *et al.* (1997). Las diferencias en la susceptibilidad entre especies fúngicas también pueden estar relacionadas con la habilidad de los ITCs para penetrar en las células (Wood, 1975). Sarwar *et al.* (1998) encontraron diferencias en la susceptibilidad a ITCs puros entre varias especies de hongos, entre ellos *P. irregulare* y *F. graminearum*, y sugieren que es posible que la diferente estructura de la membrana afecte a la eficiencia de penetración de los ITCs en las células. La composición de la pared celular y la estructura de la membrana de los *Oomycota* (filo al que pertenece el género *Phytophthora*) son distintas de las de los hongos (Bartnicki-Garcia, 1987), lo que podría tener implicaciones en las diferencias en sensibilidad a los biofumigantes encontradas entre *P. nicotianae* y *F. oxysporum*.

Las partes subterráneas de todas las especies biofumigantes ensayadas en este trabajo mostraron un efecto de inhibición significativamente mayor que las partes aéreas para *P. nicotianae*. Sin embargo, para *F. oxysporum* la situación fue distinta, ya que no hubo diferencias en el efecto de inhibición entre las partes aéreas y subterráneas, excepto en el caso de *B. oleracea*, cuya parte subterránea fue significativamente más eficaz en la inhibición que la parte aérea. Según los estudios de Mattner *et al.* (2008) las raíces maceradas de una mezcla de especies biofumigantes fueron seis veces más supresivas para *Rhizoctonia fragariae* que los tallos, indicando que las raíces tienen un mayor potencial para liberar cantidades mayores y mayor diversidad de ITCs que los tallos. Los resultados del estudio realizado por Kirkegaard y Sarwar (1998) indican que los tallos contienen predominantemente GSLs alifáticos, mientras que en las raíces predominan los GSLs aromáticos y los GSLs indólicos se encuentran en todos los tejidos en bajas concentraciones. En contraposición, Bellostas *et al.* (2004) señalaron que los GSLs alifáticos eran los predominantes en las partes vegetativas de todas las especies, aunque también estos representaban aproximadamente el 50 % de los glucosinolatos de las raíces en *B. carinata*, *B. rapa*, *B. nigra* y *B. juncea*. Sarwar *et al.* (1998) confirmaron la variación en la toxicidad según los tipos de ITCs, de

forma que los compuestos aromáticos eran más tóxicos disueltos en agar mientras que los alifáticos eran más tóxicos cuando el hongo no estaba en contacto directo con los tejidos de crucíferas, debido a la mayor volatilidad de estos compuestos.

En *P. nicotianae* se observaron diferencias significativas en la eficacia de inhibición del crecimiento micelial entre la parte aérea y subterránea de los biofumigantes, pero el orden de eficacia de las especies biofumigantes fue el mismo para las dos partes de las plantas. Esto sugiere que la diferencia de efectividad puede deberse principalmente a diferencias cuantitativas entre los GSLs de las dos partes de las plantas, más que a diferencias cualitativas entre los compuestos, es decir, que los compuestos que inhiben crecimiento de *P. nicotianae* se encuentran en la parte subterránea en mayores concentraciones que en la parte aérea.

En *F. oxysporum* no hubo diferencias en el efecto de inhibición del crecimiento micelial entre la parte aérea y subterránea de las distintas especies biofumigantes. Además, el orden de eficacia de las especies biofumigantes fue el mismo para las dos partes de las plantas (aérea y subterránea), excepto en el caso de *B. oleracea* cuya parte subterránea fue muy efectiva, mientras que la parte aérea fue la que menos inhibición produjo. Este hecho sugiere que en las especies *B. nigra*, *S. alba* y *B. napus* podría no haber diferencias, ni cualitativas ni cuantitativas, entre los compuestos presentes en la parte aérea y subterránea de las plantas y que son efectivos frente a *F. oxysporum*. Solamente las raíces de *B. oleracea* podrían contener algún tipo de compuesto diferente o en mayor concentración que en la parte aérea, capaz de inhibir de forma significativa el crecimiento del micelio de *F. oxysporum*.

Aunque los resultados obtenidos indican que la eficacia de la parte subterránea de las especies ensayadas en la inhibición del crecimiento micelial es superior (en el caso de *P. nicotianae*) o igual (en el caso de *F. oxysporum*) a la de la parte aérea, su eficacia real sería muy limitada en condiciones de campo, ya que el aporte de biomasa es muy inferior al correspondiente a la parte aérea.

Por ello, como señalaron Kirkegaard y Sarwar (1998) son los tipos de GSLs predominantes en los tejidos aéreos de cada especie los que determinan su potencial biofumigante.

Si se considera la parte aérea de los biofumigantes, la especie que más inhibió fue *C. bursa-pastoris*, mientras *B. oleracea* fue la que menos, tanto en *P. nicotianae* como en *F. oxysporum*. La eficacia de las otras especies biofumigantes varió según la especie de hongo. Estos resultados indican que hay diferencias entre los compuestos liberados por las distintas especies biofumigantes; estas diferencias pueden ser cualitativas, cuantitativas, o de ambos tipos, y son las responsables de la respuesta diferencial de los dos hongos estudiados. Cada especie de *Brassicaceae* tiene un perfil característico de glucosinolatos que se hidrolizan en sus correspondientes isotiocianatos (Smolinska *et al.*, 2003).

*C. bursa-pastoris* es una mala hierba que aparece asociada a los cultivos de crucíferas. Dada su capacidad biofumigante se podría plantear su explotación como especie biofumigante para incorporar como abono verde. Su escasa producción de biomasa es el principal factor limitante, como ocurre con otras especies de malas hierbas (Kirkegaard y Sarwar, 1998).

*B. oleracea* var. *italica* fue la especie cuya parte aérea causó la menor inhibición de crecimiento en las dos especies de hongo. Esto pudo deberse, por un lado, a la limitada capacidad de liberar ITCs, ya que aproximadamente solo la mitad de su contenido en GSLs se transforma en ITCs (Kirkegaard y Sarwar, 1998). Por otro lado, al estado fenológico elegido, que no fue el más adecuado, ya que en este estado las concentraciones de GSLs son elevadas en la pella, pero bajas en las hojas (Rangkadilok *et al.*, 2002).

Es importante conocer el perfil de glucosinolatos presente en cada especie biofumigante para plantear estrategias eficaces frente a patógenos concretos. Manici *et al.* (1997) mostraron que los productos de la hidrólisis de GSLs alifáticos como el 3-metilsulfinilpropilo-ITC fueron altamente tóxicos para *F. culmorum*. Mayton *et al.* (1996) encontraron que la toxicidad a *F. sambucinum* estaba

relacionada con la liberación de ITCs alílicos. El uso de brásicas que produzcan altas concentraciones de GSLs alifáticos con sustituciones de azufre o alílico-GSLs pueden incrementar la eficacia de la biofumigación cuando *Fusarium* spp. sea el patógeno diana (Lazzeri *et al.*, 2004).

Los GSLs predominantes en *B. oleracea* var. *italica* son GSLs alifáticos (4-metilsulfinilbutilo-GSL y 3-butenilo-GSL) e indólicos (3-indolmetilo-GSL) (Kushad *et al.*, 1999). *B. nigra* presenta una elevada concentración de 2-propenilo (GSL alifático) y en *B. napus* el perfil de GSLs está determinado por bajas concentraciones de GSLs alifáticos (3-butenilo-GSL, 4-pentenilo-GSL y formas hidroxí derivadas de estos) y GSLs aromáticos (feniletilo-GSL). *S. alba* y especies relacionadas de malas hierbas presentan bajos niveles de GSLs alifáticos y, en cambio, elevadas concentraciones de GSLs aromáticos, principalmente hidroxibenzilo-GSL y feniletilo-GSL, los cuales están ausentes en las otras especies de *Brassicaceae* (Kirkegaard y Sarwar, 1998). *C. bursa-pastoris* contiene cantidades significativas de 3-butenilo-ITC (Vaughn y Berhow, 2005) y varios GSLs que no son muy comunes, metilsulfinilalquilo-GSLs (9-metilsulfinilnonilo-GSL y 10-metilsulfinildecilo-GSL) (Daxenbichler *et al.*, 1991). Si se tiene en cuenta el tipo de GSL, aromático o alifático, predominante en las especies biofumigantes y su efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, no se aprecia una relación clara entre la toxicidad y el tipo de glucosinolato. En este sentido, Smolinska *et al.* (2003) señalaron que la actividad fungicida de los ITCs está fuertemente determinada por la naturaleza de la estructura molecular, pero esa actividad no está relacionada con el carácter alifático o aromático.

Considerando que en las especies de *Brassicaceae* ensayadas el principal aporte de biomasa es el de la parte aérea, los resultados obtenidos indican que para el control de *P. nicotianae* la especie más indicada por su eficacia en la inhibición del crecimiento micelial sería *B. napus*, aunque también serían recomendables *B. nigra* y *S. alba*. Sin embargo, para el control de *F. oxysporum* la especie más indicada sería *S. alba*. *C. bursa-pastoris* sería adecuada para el

control de los dos patógenos (*P. nicotianae* y *F. oxysporum*) pero su escasa producción de biomasa se presenta como factor que limita su aplicación práctica.

### **2.3.2. Pellets de *Brassica carinata* (BioFence®) y torta de colza como materiales biofumigantes**

En el ensayo anterior se había demostrado que las especies de *Brassicaceae* elegidas eran capaces de inhibir el crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, pero las condiciones edafoclimáticas influían decisivamente en el desarrollo de estas especies en condiciones de campo. No todas las especies germinaban igual y proporcionaban la misma producción de materia verde/seca al final del cultivo, tampoco presentaban la misma resistencia a periodos prolongados de sequía-lluvia. Además, en condiciones de campo no proporcionaban resultados satisfactorios para el control de *P. nicotianae*, como puede observarse en el apartado 3.4.2. Ante esta situación, había que buscar nuevos materiales biofumigantes cuya acción fuera independiente de las condiciones agroclimáticas, y al mismo tiempo, aseguraran un control eficaz de los patógenos estudiados.

Se optó por probar con unos pellets disponibles en el mercado con el nombre comercial de BioFence® (Triumph Italia SPA) y elaborados a partir de harina de semilla de *Brassica carinata* (Lazzeri *et al.*, 2008). Asimismo, para darle un aprovechamiento se comprobó el efecto fungicida de la harina de semilla de *B. napus* var. *oleifera* (torta de colza), subproducto agroindustrial obtenido de la extracción del aceite contenido en las semillas para la producción experimental de biodiesel en la Finca La Orden.

#### **2.3.2.1. Material y métodos**

Para evaluar la susceptibilidad de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* a los compuestos biofumigantes liberados por los pellets de *B. carinata*, BioFence® (Triumph Italia SPA) y la torta de colza (*B. napus* var. *oleifera*) se determinó la inhibición del crecimiento micelial de aislados de estas dos especies fúngicas. Se

estudió la influencia de varios factores: especie de hongo, dosis empleada y aislado.

La metodología utilizada fue una adaptación de la descrita por Morales-Rodríguez (2010). Los materiales biofumigantes (pellets o torta de colza) se distribuyeron uniformemente en el fondo de las bandejas donde fueron triturados. Para facilitar la liberación de los ITCs, se les añadió agua a razón de 3:2 ( $m_{\text{biofumigante}}: m_{\text{agua}}$ ) que se mezcló homogéneamente con el biofumigante. A continuación, en cada una de las bandejas se colocó una rejilla de plástico sobre la que se colocaron las placas de Petri con los discos de siembra y sin tapadera. Las bandejas se sellaron con plástico, se incubaron a 25 °C y a las 72 h se realizaron las medidas del diámetro de las colonias.

Se realizaron 3 repeticiones por cada dosis y material biofumigante y 3 repeticiones de testigo por cada biofumigante.

Los cálculos de la medida de la inhibición del crecimiento micelial y el análisis estadístico de los datos se realizaron de la misma forma que en el punto anterior (2.3.1).

### **2.3.2.1.1. Material biofumigante**

Como material biofumigante se emplearon pellets de *B. carinata* (BioFence®) y harina de semilla de *B. napus* var. *oleífera* (torta de colza).

#### **A. Pellets de *B. carinata***

En primer lugar se evaluó el efecto de los pellets de *B. carinata*, comercializados como BioFence®, a una dosis inicial de 96 g. Posteriormente, en base a los resultados de inhibición obtenidos con esta dosis inicial y varias pruebas posteriores, la dosis fue significativamente reducida a 0,1875 g de BioFence® con el objeto de obtener inhibiciones similares a las obtenidas al utilizar material fresco de las especies de *Brassicaceae*.



Se realizaron 3 repeticiones por aislado fúngico y 3 repeticiones de testigo.

## **B. Torta de colza**

Se evaluó el efecto de la dosis empleada, 24 g y 48 g, en la inhibición del crecimiento de las dos especies de hongos. Se realizaron 3 repeticiones por cada dosis y 3 repeticiones de testigo.

Previamente se habían realizado análisis con dosis de 0,1 g, 0,25 g, 0,5 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 6 g y 12 g, pero la inhibición fue muy reducida o nula en la mayoría de los aislados fúngicos.

### **2.3.2.1.2. Material fúngico**

El material fúngico utilizado fueron 12 aislados, que se cultivaron en medio PDA:

- 6 aislados de *P. nicotianae*: los mismos que en el apartado 2.2.1.2.2 (P13, P23, P32, T3, T6 y T8).
- 6 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *batatas* procedentes de plantas de tabaco del valle del Tiétar (M22-1, M23-4, M31-3, M32-3, M51-2, M57-3).

### **2.3.2.2. Resultados**

#### **2.3.2.2.1. Efecto de los pellets de *B. carinata* en la inhibición del crecimiento micelial**

La dosis inicial de 96 g de BioFence® inhibió significativamente a las dos especies de hongos, e incluso, la inhibición fue del 100 % en algunos aislados. El análisis de la varianza a una vía (especie) no mostró diferencias significativas de inhibición entre las especies fúngicas para esta dosis ( $F=1,24$ ;  $P>0,05$ ). La inhibición media ( $\pm$  desviación estándar) fue del  $94,26 \pm 3,11$  %.

Con respecto a la dosis de 0,1875 g, los resultados del análisis de la varianza a una vía (especie) mostraron diferencias significativas de inhibición entre las especies de hongos ( $F=12,52$ ;  $P<0,05$ ). La inhibición causada por los

pellets de *B. carinata* fue significativamente mayor para *P. nicotianae* ( $26,00 \pm 14,60$  %) que para *F. oxysporum* ( $11,00 \pm 9,23$  %). Los datos mostraron una variabilidad muy alta, que podría estar asociada a la diferente sensibilidad de estos aislados frente a los compuestos, por ello, se hizo un análisis de varianza a una vía (aislado) para cada especie de hongo.

Los resultados mostraron diferencias significativas de inhibición entre los aislados de *P. nicotianae* ( $F=6,84$ ;  $P<0,05$ ) y *F. oxysporum* ( $F=280,79$ ;  $P<0,05$ ). Para ambas especies de hongos se diferenciaron dos grupos homogéneos para los aislados de *P. nicotianae* y cuatro grupos para *F. oxysporum* (Tabla 2.7).

**Tabla 2.7.** Inhibición del crecimiento miceliar (%) (valor medio  $\pm$  desviación estándar) de los aislados de las especies fúngicas *P. nicotianae* y *F. oxysporum* por el efecto biofumigante de los pellets de *B. carinata*.

Especie de hongo	Aislado	Inhibición
<i>P. nicotianae</i>	P13	$18,42 \pm 4,55$ b
	P23	$19,04 \pm 2,43$ b
	P32	$39,22 \pm 2,19$ a
	T3	$30,49 \pm 3,34$ a
	T6	$29,47 \pm 10,13$ a
	T8	$19,35 \pm 6,58$ b
<i>F. oxysporum</i>	M22-1	$6,33 \pm 2,06$ bc
	M23-4	$3,60 \pm 0,93$ cd
	M31-3	$2,70 \pm 1,39$ d
	M32-3	$42,65 \pm 2,58$ a
	M51-2	$5,26 \pm 0,77$ bcd
	M57-3	$6,74 \pm 0,88$ b

Los aislados de cada especie fúngica seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P>0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey.

Los aislados de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* más sensibles a los compuestos liberados por los pellets de *B. carinata* fueron P32 y M32-3, respectivamente.

Cabe señalar que los aislados de *F. oxysporum* expuestos a los compuestos volátiles liberados por los pellets de *B. carinata* mostraron diferencias en la morfología y color con los respectivos aislados sin tratamiento (testigos).

### 2.3.2.2.2. Efecto de la torta de colza en la inhibición del crecimiento micelial

Las dos dosis empleadas de torta de colza (24 y 48 g) inhibieron el crecimiento micelial de *P. nicotianae* y de *F. oxysporum*. Los resultados del análisis de la varianza con dos factores fijos (especie de hongo y dosis) se presentan en la Tabla 2.8.

**Tabla 2.8.** Efecto de la especie de hongo (E), dosis (D) y la interacción especie biofumigante x dosis (ExD) en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. ANOVA con dos factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Especie de hongo (E)	0,28	1	0,28	32,85	0,00
Dosis (D)	0,08	1	0,08	9,43	0,00
ExD	0,00	1	0,00	0,08	0,77
Residuos	0,58	68	0,00		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

La inhibición del crecimiento micelial difirió significativamente entre especies de hongo y dosis empleadas, por el contrario, la interacción de ambos factores no fue significativa. Posteriormente, se realizaron los análisis de la varianza a una vía para cada uno de los factores estudiados.

El análisis de la varianza para el factor fijo especie de hongo, mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de inhibición entre las especies ( $F = 29,66$ ). *P. nicotianae* ( $33,33 \pm 10,97$  %) presentó una inhibición significativamente mayor que *F. oxysporum* ( $21,47 \pm 7,12$  %). En relación a la dosis empleada, los resultados del análisis de varianza a una vía indicaron que la inhibición difirió significativamente entre dosis ( $F = 6,54$ ;  $P < 0,05$ ). La dosis de 24 g, que produjo una inhibición media ( $\pm$  desviación estándar) de  $24,17 \pm 11,42$  %, fue significativamente menos efectiva que la de 48 g, con un valor medio de inhibición de  $30,64 \pm 9,56$  %.

Asimismo, para cada una de las especies fúngicas se estudió la diferencia de sensibilidad entre los aislados, para ello se realizaron ANOVAs a dos vías (aislado y dosis), cuyos resultados se presentan en la Tabla 2.9.

**Tabla 2.9.** Efecto del aislado (A), dosis (D) y la interacción aislado x dosis (AxD) en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. ANOVAs con dos factores fijos.

<b>Especie de hongo</b>	<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<i>P. nicotianae</i>	Aislado (A)	0,29	5	0,06	11,36	0,00
	Dosis (D)	0,03	1	0,03	6,44	0,02
	AxD	0,03	5	0,01	1,09	0,39
	Residuos	0,12	24	0,01		
<i>F. oxysporum</i>	Aislado (A)	0,09	5	0,02	9,64	0,00
	Dosis (D)	0,05	1	0,05	27,29	0,00
	AxD	0,01	5	0,00	1,25	0,32
	Residuos	0,04	24	0,00		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Los resultados mostraron diferencias significativas de inhibición entre los aislados y dosis para las dos especies de hongos, sin embargo, la interacción aislado x dosis no fue significativa. Posteriormente, se realizó un ANOVA simple a una vía (aislado) para cada especie fúngica (Tabla 2.10) y estos análisis indicaron la existencia de diferencias de inhibición entre los aislados de las dos especies de hongos. A continuación, se realizó un test de comparaciones de medias (Test de Tukey) para cada especie fúngica, agrupándose los aislados en varios grupos homogéneos como puede observarse en la Tabla 2.11.

**Tabla 2.10.** Efecto del aislado (A) en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. ANOVAs con un factor fijo.

<b>Especie de hongo</b>	<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<i>P. nicotianae</i>	Aislado (A)	0,29	5	0,06	9,51	0,00
	Residuos	0,19	30	0,00		
<i>F. oxysporum</i>	Aislado (A)	0,09	5	0,02	5,02	0,00
	Residuos	0,10	30	0,00		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

**Tabla 2.11.** Inhibición del crecimiento micelial (%) (valor medio  $\pm$  desviación estándar) de los aislados de las especies fúngicas *P. nicotianae* y *F. oxysporum* por el efecto biofumigante de la torta de colza.

Especie de hongo	Aislado	Inhibición
<i>P. nicotianae</i>	P13	36,67 $\pm$ 6,28 b
	P23	38,63 $\pm$ 6,76 ab
	P32	45,98 $\pm$ 7,92 a
	T3	31,62 $\pm$ 5,04 bc
	T6	19,25 $\pm$ 8,72 d
	T8	27,84 $\pm$ 8,74 cd
<i>F. oxysporum</i>	M22-1	14,84 $\pm$ 8,81 c
	M23-4	19,59 $\pm$ 5,04 bc
	M31-3	20,89 $\pm$ 3,14 bc
	M32-3	30,27 $\pm$ 7,27 a
	M51-2	19,52 $\pm$ 3,07 bc
	M57-3	23,72 $\pm$ 4,35 ab

Los aislados para cada especie fúngica seguidos de las mismas letras no difieren estadísticamente (Test de Tukey,  $P > 0,05$ ).

Al igual que para los pellets de *B. carinata*, los aislados de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* más sensibles a los compuestos liberados por la torta de colza fueron P32 y M32-3, respectivamente.

Por último, para cada especie fúngica se realizó un análisis de la varianza a una vía (dosis). Los resultados solo mostraron diferencias significativas de inhibición entre las dos dosis para *F. oxysporum* ( $F=11,83$ ;  $P < 0,05$ ). El valor medio de inhibición ( $\pm$  desviación estándar) de *F. oxysporum* a la dosis de 24 g ( $17,90 \pm 6,24$  %) fue menor que a 48 g ( $25,04 \pm 6,20$  %).

Los aislados fúngicos de *F. oxysporum* en presencia de los compuestos volátiles liberados por los pellets y la torta de colza mostraron diferencias en relación a la morfología y color de sus colonias con respecto a los testigos.

### 2.3.2.3. Discusión

Los pellets de *B. carinata* y la torta de colza inhibieron el crecimiento micelial de los aislados de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*.

Varios autores han descrito la inhibición del crecimiento micelial por harina de semillas de brásicas para distintas especies fúngicas: *Aphanomyces euteiches* (Smolinska *et al.*, 1997), *F. oxysporum* (Fayzalla *et al.*, 2009; Shaban *et al.*, 2011), *Fusarium sambucinum* (Mayton *et al.*, 1996), *Pythium ultimum* (Charan *et al.*, 1999), *Rhizoctonia solani* (Charan *et al.*, 1999, Fayzalla *et al.*, 2009). Por otra parte, en la literatura científica se ha registrado la inhibición del micelio por el uso de pellets (BioFence®) en *P. nicotianae* (Morales-Rodríguez *et al.*, 2014; Serrano-Pérez *et al.*, 2017), *Phytophthora cinnamomi* (Morales-Rodríguez *et al.*, 2016) y *Fusarium circinatum* (Morales-Rodríguez *et al.*, 2018).

Con este último estudio sobre la inhibición del crecimiento micelial se corrobora que *P. nicotianae* es más susceptible que *F. oxysporum* al efecto biofumigante de todos los materiales biofumigantes ensayados (brásicas en verde, torta de colza y pellets (BioFence®). Y como se ha dicho anteriormente, estas diferencias de sensibilidad pueden atribuirse a la composición de la pared celular y estructura de la membrana de cada una de estas especies fúngicas, y que influyen en la penetración de los ITCs en las células.

La variación en la sensibilidad a diferentes ITCs no es solo entre especies de hongos, sino que estas diferencias se encuentran también entre aislados de una misma especie (Mari *et al.*, 1993; Smith y Kirkegaard, 2002). Morales-Rodríguez *et al.* (2010, 2012) reportaron la existencia de diferencias de inhibición entre aislados de *P. nicotianae* por el efecto biofumigante de distintas especies de *Brassicaceae* en fresco y en forma de pellets (Morales-Rodríguez *et al.*, 2014; Serrano-Pérez *et al.*, 2017).

En este ensayo, los pellets de *B. carinata* (BioFence®) inhibieron significativamente el crecimiento de las dos especies de hongos estudiadas, *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, a una dosis muy baja (0,1875 g) frente a los 320 g utilizados de material fresco. La importancia de este producto comercial radica en la elevada toxicidad que permite inhibir el crecimiento de las especies fúngicas con cantidades mínimas de producto. La cantidad de material fresco utilizada en los ensayos fue de 96 g, a esta dosis de BioFence® se produjo la inhibición del

100 % de algunos aislados. La toxicidad de los pellets (BioFence®) se ha comprobado en distintos patógenos del suelo (Núñez-Zofio *et al.*, 2011; Guerrero-Díaz *et al.*, 2013; Gilardi *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2016).

En los resultados de este estudio se observó que *P. nicotianae* fue más sensible que *F. oxysporum* a los compuestos liberados por los pellets, además, para cada especie de hongo se observaron diferencias significativas de inhibición entre los aislados estudiados. Los aislados más sensibles a los productos liberados por los pellets fueron P32 y M32-3 para *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, respectivamente. En concordancia con estos resultados, Morales-Rodríguez *et al.* (2014) y Serrano-Pérez *et al.* (2017) reportaron diferencias de sensibilidad entre los aislados de *P. nicotianae* por el efecto de los pellets de *B. carinata* en un estudio de inhibición del crecimiento micelial.

Con respecto a la torta de colza, las dos dosis ensayadas (24 y 48 g) inhibieron los aislados fúngicos de ambas especies de hongos, siendo más efectiva la dosis mayor. Las dosis empleadas fueron muy superiores a las utilizadas para los pellets de *B. carinata*, y a su vez, inferiores a las del material fresco. Al igual que para los pellets, *P. nicotianae* fue más sensible que *F. oxysporum*, hubo diferencias de susceptibilidad entre los aislados y coincidieron los aislados más sensibles para ambas especies fúngicas. La supresión del crecimiento micelial por la torta de colza ha sido objeto de varios estudios. Smolinska *et al.* (1997) observaron una supresión total del crecimiento micelial de *Aphanomyces euteiches* por el uso de torta de colza de *B. napus*, a razón de 5 g por placa. Fayzalla *et al.* (2009) reportaron una reducción del crecimiento lineal de *F. oxysporum*, *R. solani*, *M. phaseolina* y *S. rolfsii* por la aplicación de torta de colza de *B. juncea*. *R. solani* fue la especie más sensible a los compuestos liberados por el material biofumigante. Kirkegaard *et al.* (1996) estudiaron el efecto fungicida de la harina de semilla de *B. napus* y observaron que el micelio de las colonias de los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Bipolaris* fueron reducidas en un 80 % con respecto al control.



En este ensayo también se observaron cambios en la morfología y color de las colonias de los aislados de *F. oxysporum* con respecto a las colonias de los testigos no biofumigados. Por tanto, se corroboran los efectos de los compuestos volátiles liberados por los materiales biofumigantes en la morfología y coloración de *F. oxysporum*, ya previamente descritos por otros autores (Kirkegaard *et al.*, 1996; Sarwar *et al.*, 1998).

En general, los resultados obtenidos en estos ensayos ponen de manifiesto la existencia de diferencias entre los compuestos liberados por los distintos materiales biofumigantes ensayados; estas diferencias pueden ser cualitativas, cuantitativas, o de ambos tipos, y son las responsables de la respuesta diferencial de las especies fúngicas estudiadas. Como se afirmó en el punto anterior, es importante conocer el perfil de glucosinolatos de los materiales a utilizar para predecir la eficacia de estos materiales frente a patógenos concretos. Tanto en pellets como torta de colza predominan los compuestos alifáticos. La sinigrina (alil-glucosinolato o 2-propenilo-GSL) es el GSL mayoritario en los pellets, los cuales, una vez humedecidos, liberan mayoritariamente alil-ITC y nitrilos (Lazzeri *et al.* 2008; De Nicola *et al.*, 2013). En cuanto a la torta de colza de *B. napus*, según Handiseni *et al.* (2011) los principales glucosinolatos presentes en esta fueron 2-hidroxi-3-butenilo-GSL y 3-butenilo-GSL.

En conclusión, de todos los materiales ensayados, destacó el efecto fungicida de los pellets (BioFence®) que con dosis muy reducidas suprimió el crecimiento micelial con porcentajes similares a los obtenidos por las especies de *Brassicaceae* en verde o en forma de harina de semilla. El elevado contenido de compuestos alifáticos en los pellets podría justificar su toxicidad frente a las especies fúngicas al tratarse de compuestos más volátiles (Sarwar *et al.*, 1998). Por otra parte, Morales-Rodríguez *et al.* (2014) sugirieron que la mayor eficacia de los pellets de *B. carinata* en comparación con el material fresco de especies de *Brassicaceae* pudo deberse a una mayor desintegración de los tejidos por el proceso de peletización, lo que implicó una mayor liberación de ITCs.

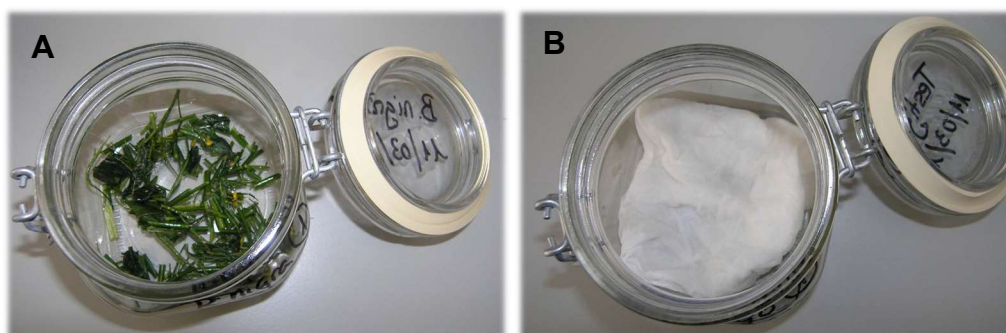
## **2.4. Inactivación del inóculo de *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum***

Una vez demostrado que las especies de *Brassicaceae* (en fresco), la torta de colza y los pellets de *B. carinata* (BioFence®) inhibían el crecimiento del micelio, había que comprobar si estos materiales biofumigantes eran capaces de inactivar los distintos tipos de propágulos fúngicos (conidias, clamidosporas, esporangios...) de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. Asimismo, era de gran interés determinar las condiciones óptimas para lograr la inactivación del 100 % del inóculo.

### **2.4.1. Material y métodos**

Se evaluó el efecto de especies de *Brassicaceae* en fresco, pellets de *B. carinata* (BioFence®) y torta de colza en la inactivación de distintos tipos de inóculo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* en diferentes condiciones de temperatura.

Para el estudio de la inactivación se siguió la metodología puesta a punto por Rodríguez-Molina *et al.* (2010a), se prepararon bolsas de tela de aguil con muestras de 5 g de tierra desinfectada e inoculada con el tipo y densidad de inóculo correspondiente a cada ensayo. Las bolsas se introdujeron en tarros de vidrio de 0,5 l y cierre hermético en cuya base se dispusieron 10 g del material biofumigante a ensayar previamente triturado (Figura 2.8.A). Se incluyeron testigos no biofumigados, con papel humedecido en el fondo de los recipientes (Figura 2.7.B). Los tarros se incubaron durante establecidos periodos de tiempo en regímenes distintos de temperatura, según el estudio. Se realizaron 4 repeticiones por material biofumigante, temperatura y especie de hongo. Se calculó el porcentaje de inactivación del inóculo con respecto a la densidad del inóculo en los testigos al finalizar el ensayo.



**Figura 2.8.A.** Triturado de material biofumigante en fresco (*B. nigra*) en tarro de 0,5 l con cierre hermético (Recuperado de Picón-Toro, 2011). **B.** Tarro con papel humedecido en el fondo (testigo no biofumigado) (Recuperado de Picón-Toro, 2011).

La tierra inoculada con las especies de hongos no entró en contacto directo con el biofumigante (Figura 2.9), de manera que solo los compuestos volátiles liberados intervinieron en la inactivación del inóculo. El diseño de esta metodología evita la influencia de factores del suelo que pueden interferir en la liberación de ITCs, como son el pH y la humedad (Coelho *et al.*, 2001; Morra y Kirkegaard, 2002; Mattner *et al.*, 2008).



**Figura 2.9.** Tarro con triturado de *B. nigra* y bolsas de agril con tierra inoculada (Recuperado de Picón-Toro, 2011).

#### 2.4.1.1. Preparación y cuantificación del inóculo

##### 2.4.1.1.1. Inóculo de *Phytophthora nicotianae*

En el caso de *Phytophthora nicotianae* se prepararon dos tipos de inóculo: triturado miceliar y clamidosporas. Para la preparación de los dos tipos de inóculo se empleó un aislado de *P. nicotianae* procedente de una planta de pimiento afectada de tristeza.

### **A. Triturado miceliar**

Para la preparación del triturado miceliar se sembró el aislado en una placa de Petri (90 mm de diámetro) con 18 ml de medio agar-V8 (Miller, 1955) y cuando el crecimiento de la colonia alcanzó el borde de la placa, se tomaron 3-4 fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> que se pasaron a una placa de Petri con 15-18 ml de V8 líquido. Las placas se incubaron a 25 °C y una vez que el micelio cubrió toda la superficie de la placa (10-15 días) se separó del medio de cultivo y se lavó con agua destilada estéril para eliminar los restos de medio. Se homogeneizó el micelio con 50 ml de agua destilada estéril en un homogeneizador durante 5-7 minutos, obteniéndose una suspensión miceliar.

Se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por ml de suspensión miceliar. Para esto se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) en agua destilada y 1 ml de cada una de las diluciones se extendió uniformemente por la superficie de una placa de Petri de 90 mm de diámetro con 10 ml de medio PARP (Jeffers y Martin, 1986). Por cada dilución se prepararon 10 repeticiones, tras 48 h de incubación a 25 °C se contabilizaron las u.f.c., expresándose los resultados en u.f.c.·ml<sup>-1</sup>.

### **B. Clamidosporas**

Para la producción de clamidosporas se siguió la metodología basada en la descrita por Tsao (1971) y por Mitchell y Kannwischer-Mitchell (1992). El aislado se cultivó en frascos con 25 ml de medio V8 líquido, se incubó a 25 °C en oscuridad durante 1 día en posición vertical, y durante 6 días más en posición horizontal. Después se añadieron 100 ml de agua estéril para sumergir el micelio, y se incubó a 18 °C con los frascos en posición vertical, al menos 3 semanas.

Pasado el tiempo de incubación las matas de micelio se lavaron con agua destilada estéril, se homogeneizaron en un homogeneizador y se centrifugaron para eliminar los fragmentos pequeños de micelio. La resuspensión se sometió a un tratamiento con ultrasonidos en sonicador y el número de clamidosporas en la suspensión resultante se determinó empleando una cámara de Neubauer. El porcentaje de clamidosporas viables se determinó mediante tinción con rosa de bengala según el método descrito por Mircetich *et al.* (1968) para clamidosporas de *P. cinnamomi* y utilizado por Tsao (1971) para *P. parasitica*, de forma que las clamidosporas dañadas e inviables se tiñen selectivamente de color rosa.

#### **2.4.1.1.2. Cuantificación del inóculo de *P. nicotianae***

Para la cuantificación del inóculo viable, presente en los 5 g de tierra, de las bolsas después del tiempo de incubación se utilizó el método de la dilución en placa en medio PARP, tanto para la tierra inoculada con triturado miceliar como con clamidosporas. Las muestras de 5 g se diluyeron en 50 ml de agar-agua al 0,25 % y 1 ml de cada una de las diluciones se extendió de forma uniforme por la superficie de una placa de Petri (90 mm de diámetro) conteniendo 10 ml de medio PARP. Por cada muestra se prepararon 10 repeticiones y tras 48 h de incubación a 25 °C se contabilizaron las colonias, expresándose los datos en u.f.c.·g<sup>-1</sup> de suelo.

#### **2.4.1.1.3. Inóculo de *Fusarium oxysporum***

En el caso de *Fusarium oxysporum* tan solo se preparó un tipo de inóculo: inóculo-talco. Se empleó un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *batatas* procedente de una planta de tabaco afectada de fusariosis vascular.

El inóculo-talco de *F. oxysporum* se preparó según la metodología descrita por Tello-Marquina *et al.* (1980). El aislado de *F. oxysporum* se sembró en una placa de Petri de 90 mm con 18 ml de medio PDA, cuando la colonia llegó al borde se dividió en trozos pequeños que se transfirieron a 1 l de medio PDA líquido. En este medio, el aislado se cultivó durante siete días en agitación a temperatura

ambiente. Posteriormente el medio se filtró por muselina estéril y se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 25 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en agua destilada estéril y se mezcló asépticamente con talco a razón de 1 ml de suspensión por 2 g de talco. La mezcla se desecó en un desecador de vidrio y después se trituró antes de ser introducido en un recipiente estéril en el que se conservó a la temperatura ambiente del laboratorio

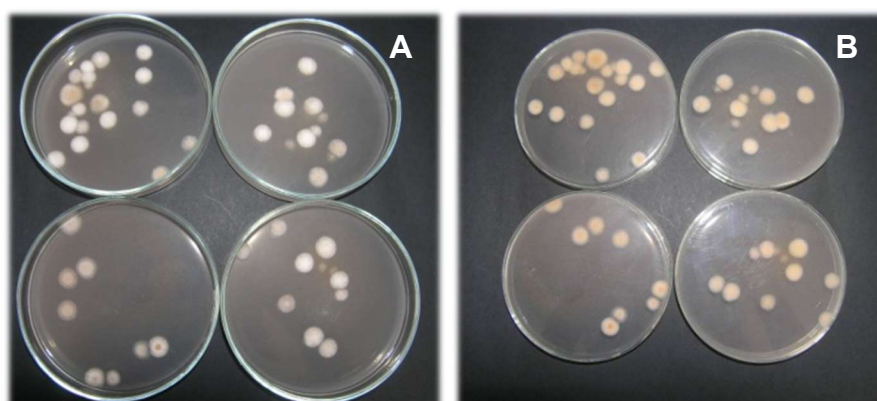
Se determinó la densidad del inóculo de *F. oxysporum* preparando diluciones seriadas en agua destilada estéril desde  $10^{-1}$  hasta la  $10^{-6}$ . Por cada dilución preparada se analizaron 10 ml repartidos en 10 placas de Petri a razón de 1 ml por placa. A cada placa se incorporaron 10 ml de medio agar-malta acidificado. Tras homogeneizar el contenido de las placas, estas se incubaron a 25 °C y oscuridad durante cuatro días, pasado este tiempo se contabilizaron las colonias. La concentración del inóculo-talco empleado fue de  $3,05 \cdot 10^7$  u.f.c.·ml<sup>-1</sup>.

#### **2.4.1.1.4. Cuantificación del inóculo de *Fusarium oxysporum***

Para cuantificar el inóculo viable en los 5 g de tierra de las bolsas después del tiempo de incubación en las distintas condiciones se siguió el método descrito por Tello *et al.* (1991) y Rodríguez-Molina (1996) basado en añadir una pequeña cantidad de tierra a analizar al medio selectivo de Komada (1975) en fusión. Así, los 5 g de tierra contenidos en cada bolsa se extendieron en una placa de Petri (55 mm de diámetro) para la desecación a temperatura ambiente durante 3 días. Previo al análisis, se trituraron las muestras de tierra con un mortero de porcelana y se tamizaron con un tamiz de 200 µm de luz. Tanto el mortero como el tamiz se desinfectaron entre muestra y muestra flameando con alcohol.

Por cada muestra muestra de tierra a analizar se prepararon cuatro tubos eppendorf de 1 ml con una cantidad de tierra comprendida entre 0,8640 g y 0,9206 g. El medio Komada se enfrió hasta 40-42 °C y se dispensó en placas de Petri de vidrio (90 mm) a razón de 8 ml por placa y en fusión se añadió la tierra contenida en cada uno de los tubos, homogeneizándose con ligeros movimientos. Las placas se incubaron a 25-28 °C bajo luz fluorescente continua durante 5 días.

Pasado este tiempo, se contaron las colonias desarrolladas en cada placa (Figura 2.10) y los resultados fueron expresados en u.f.c.·g<sup>-1</sup> de tierra.



**Figura 2.10.** Placas de vidrio con colonias de *F. oxysporum* sobre medio Komada. **A:** en posición normal. **B:** en posición invertida (Imágenes recuperadas de Picón-Toro, 2011).

#### 2.4.2. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico los datos relativos al porcentaje de inactivación se expresaron en tanto por uno, realizándose posteriormente la transformación “arcoseno” para cumplir los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Sokal y Rohlf, 1995). En el resto de los datos no se realizó transformación para el análisis estadístico de los mismos. Posteriormente, los datos se analizaron mediante el análisis de varianza seguido del test de Tukey para la determinación de grupos homogéneos. Para la realización de los análisis se utilizó el paquete de software R versión 3.5.1 (R Development Core Team, 2018).

#### 2.4.3. Efecto de las especies de *Brassicaceae*, pellets de *B. carinata* y de la temperatura constante y fluctuante

Con el objeto de evaluar las condiciones óptimas para la inactivación del inóculo se ensayaron los materiales biofumigantes en diferentes regímenes de temperatura constante y fluctuante.



## **A. Ensayo en condiciones de temperatura constante con especies de *Brassicaceae***

Se estudió el efecto de la inactivación en el triturado miceliar de *P. nicotianae* y el inóculo-talco de *F. oxysporum*, inoculados a razón de  $10^3$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> y  $10^5$  u.f.c. g<sup>-1</sup> de tierra, respectivamente.

Se ensayaron dos condiciones de temperatura constante, 20 °C y 25 °C, durante un periodo de 14 días.

Como material biofumigante se empleó la parte aérea (tallos, hojas, flores y silicuas) de 3 especies de *Brassicaceae*: *B. nigra*, *S. alba* y *C. bursa-pastoris*. El estado fenológico de las plantas en el momento de realizar el ensayo fue, según las claves de Berkenkamp (1973): 4.4 (todas las semillas marrones en las silicuas inferiores de los racimos) en *B. nigra*, 3.0 (apertura de primeras flores en la yema terminal) en *S. alba* y 4.5 (todas las semillas marrones en las silículas superiores de los racimos) en *C. bursa-pastoris*.

### **A.1. Resultados**

Las tres especies de *Brassicaceae* inactivaron parte del inóculo de *P. nicotianae* y de *F. oxysporum*.

Los resultados del análisis de la varianza con tres factores fijos (especie de hongo, especie biofumigante y temperatura) realizado para estudiar el efecto de los factores en la inactivación del inóculo se presentan en la Tabla 2.12.

**Tabla 2.12.** Efecto de la especie de hongo (E), el biofumigante (B), la temperatura ( $T^a$ ) y las interacciones especie de hongo x biofumigante (ExB), especie de hongo x temperatura (Ex $T^a$ ), biofumigante x temperatura (Bx $T^a$ ) y especie de hongo x biofumigante x temperatura (ExBx $T^a$ ) en la inactivación del inóculo. ANOVA con tres factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Especie de hongo (E)	9,47	1	9,47	360,55	0,00
Biofumigante (B)	16,93	2	8,47	532,61	0,00
Temperatura ( $T^a$ )	14,00	1	14,00	322,22	0,00
ExB	6,05	2	3,03	115,17	0,00
Ex $T^a$	4,08	1	4,08	155,27	0,00
Bx $T^a$	1,69	2	0,86	32,17	0,00
ExBx $T^a$	0,52	2	0,26	9,89	0,00
Residuos	7,59	289	0,03		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

La inactivación del inóculo difirió significativamente entre especies de hongos, biofumigantes y temperaturas y fueron significativas todas las interacciones. Por ello, se realizaron análisis de varianza con dos factores fijos (biofumigante y temperatura) para cada especie de hongo ensayada y los resultados se presentan en la Tabla 2.13.

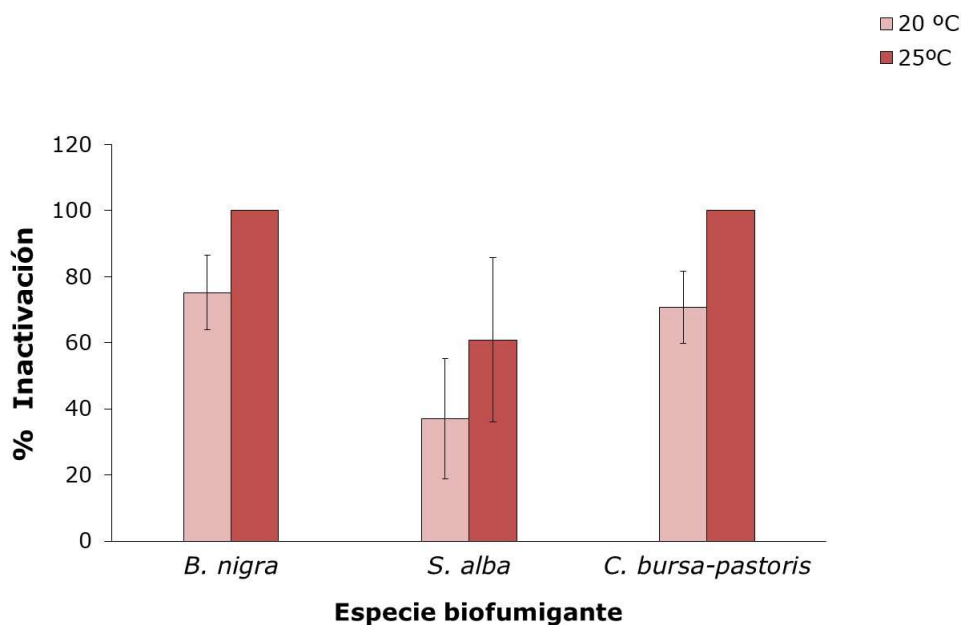
**Tabla 2.13.** Efecto del biofumigante (B), de la temperatura ( $T^a$ ) y la interacción biofumigante x temperatura (Bx $T^a$ ) en la inactivación del inóculo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. ANOVAs con dos factores fijos.

Especie de hongo	Fuente	SC	gl	CM	F	P
<i>P. nicotianae</i>	Biofumigante (B)	23,16	2	11,58	329,85	0,00
	Temperatura ( $T^a$ )	17,20	1	17,20	490,00	0,00
	Bx $T^a$	2,04	2	1,02	29,11	0,00
	Residuos	7,16	204	0,04		
<i>F. oxysporum</i>	Biofumigante (B)	0,50	2	0,25	48,78	0,00
	Temperatura ( $T^a$ )	0,20	1	0,20	40,10	0,00
	Bx $T^a$	0,17	2	0,08	16,36	0,00
	Residuos	0,43	85	0,00		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

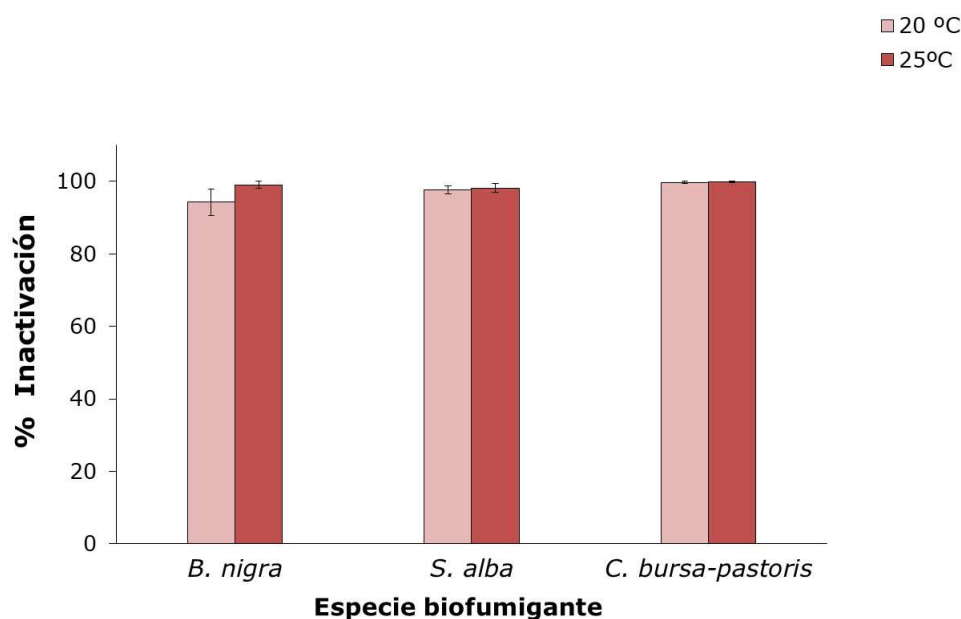
Para las dos especies de hongos la inactivación del inóculo difirió significativamente entre biofumigantes y temperaturas, y fue significativa la interacción biofumigante x temperatura.

En el caso de *P. nicotianae*, para cada temperatura se realizó un ANOVA con un factor fijo (biofumigante) seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey. El efecto de la especie biofumigante fue significativo tanto a 20 °C ( $F=57,76$ ;  $P<0,05$ ) como a 25 °C ( $F=306,07$ ;  $P<0,05$ ). Y se diferenciaron significativamente ( $P<0,05$ ) dos grupos homogéneos para cada temperatura (Figura 2.11), y el orden de los biofumigantes, de mayor a menor inactivación del inóculo, fue el mismo para las dos temperaturas: *C. bursa-pastoris* = *B. nigra* > *S. alba*. Se realizaron ANOVAs con un factor fijo (temperatura) para cada especie biofumigante. El efecto de la temperatura fue significativo para *B. nigra* ( $F=665,15$ ;  $P<0,05$ ), *S. alba* ( $F=21,104$ ;  $P<0,05$ ) y *C. bursa-pastoris* ( $F=521,19$ ;  $P<0,05$ ). En la Figura 2.11 se observan claramente diferencias en la inactivación del inóculo entre las dos temperaturas ya que para todas las especies biofumigantes la inactivación a 25 °C fue mayor que a 20 °C.



**Figura 2.11.** Inactivación del inóculo de *P. nicotianae* (%  $\pm$  desviación estándar) producido por cada una de las especies biofumigantes para las dos temperaturas ensayadas. Para cada temperatura, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P<0,05$ ).

Igual que en el caso de *P. nicotianae*, para *F. oxysporum*, se realizó un ANOVA con un factor fijo (biofumigante) para cada temperatura seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey. El efecto de la especie biofumigante fue significativo tanto a 20 °C ( $F=50,16$ ;  $P<0,05$ ) como a 25 °C ( $F=13,32$ ;  $P<0,05$ ). Para la temperatura de 20 °C, se diferenciaron significativamente ( $P<0,05$ ) tres grupos homogéneos (Figura 2.12), y el orden de los biofumigantes de mayor a menor efecto en la inactivación del inóculo fue el siguiente: *C. bursa-pastoris* > *S. alba* > *B. nigra*. Sin embargo, a 25 °C, solo se diferenciaron dos grupos homogéneos: *C. bursa-pastoris* > *S. alba* = *B. nigra*. Para estudiar el efecto de la temperatura se realizó un ANOVA con un factor fijo (temperatura) para cada una de las especies biofumigantes. Los resultados de los ANOVAs indican que no hay diferencias significativas entre temperaturas para *S. alba* ( $F=1,81$ ;  $P>0,05$ ) y *C. bursa-pastoris* ( $F=3,55$ ;  $P>0,05$ ) y si para *B. nigra* ( $F=40,23$ ;  $P<0,05$ ), siendo significativamente mayor la inactivación a 25 °C ( $99,0 \pm 1,0$  %) que a 20 °C ( $94,3 \pm 3,7$  %).



**Figura 2.12.** Inactivación del inóculo de *F. oxysporum* (%  $\pm$  desviación estándar) producido por cada una de las especies biofumigantes para las dos temperaturas ensayadas. Para cada temperatura, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P>0,05$ ).

## A.2. Discusión

Los resultados obtenidos en este ensayo indican que las distintas especies de *Brassicaceae* y la temperatura influyeron en la inactivación del inóculo de *P. nicotianae* y de *F. oxysporum*. Así, se observaron diferencias en la inactivación del inóculo en función de la especie de hongo, la temperatura y la especie biofumigante ensayada.

Las especies de *Brassicaceae* ensayadas a 20 y 25 °C produjeron inactivación del inóculo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, lo que indica que a esas temperaturas relativamente bajas respecto a las de solarización, los tejidos de las *Brassicaceae* liberan compuestos volátiles que son tóxicos para los propágulos fúngicos. Se observaron diferencias de susceptibilidad entre las dos especies de hongos, mostrándose *F. oxysporum* más sensible que *P. nicotianae* a las dos temperaturas constantes ensayadas. Sin embargo, en el estudio de la inhibición del crecimiento micelial descrito en el punto 2.3. del presente capítulo, *F. oxysporum* se mostró menos sensible que *P. nicotianae* a las especies de *Brassicaceae* en fresco, pellets de *B. carinata* y torta de colza. Las diferencias en susceptibilidad observadas entre especies pueden estar relacionadas con los distintos tipos de inóculo de cada especie empleados en cada ensayo. A diferencia de los ensayos de inhibición de crecimiento micelial, en los ensayos de inactivación se emplean inóculos compuestos por distintos tipos de propágulos. En el triturado de micelio de *P. nicotianae* se pueden encontrar fragmentos de micelio, esporangios, zoosporas y clamidosporas, y el inóculo-talco de *F. oxysporum* según Couteaudier (1989) está constituido principalmente por microconidias de pared simple (40 %) y microconidias de doble pared (38 %) denominadas microclamidosporas. Smolinska *et al.* (2003) realizaron un estudio para evaluar la sensibilidad de cuatro aislados de *F. oxysporum* en distintos etapas de desarrollo a la exposición de ITCs puros. Los resultados indicaron que para esta especie, la inhibición del crecimiento micelial fue relativamente pequeña, sugiriendo que el micelio representa una etapa bastante resistente en el ciclo de vida del patógeno. Del mismo modo, la formación de conidias tampoco

se vio afectada por los ITCs. Por el contrario, la germinación de conidias y clamidosporas se redujo considerablemente por el efecto de los ITCs, concluyendo que estas dos etapas del ciclo de vida de *F. oxysporum* son las más susceptibles a los tratamientos biofumigantes. La susceptibilidad de *P. nicotianae* según la fase del ciclo de vida parece diferir de lo observado en *F. oxysporum*, ya que Greenhalgh y Mitchell (1976) señalan que el efecto del propenilo-ITC en el micelio de *P. nicotianae* debería ser más perjudicial que en los esporangios, porque el micelio es una etapa activa mientras que la etapa de esporangio no.

Los resultados obtenidos indican que en el caso de *F. oxysporum* los compuestos volátiles liberados a temperaturas relativamente bajas (20 y 25 °C) inactivan más del 90 % del inóculo en todos los casos. *C. bursa-pastoris* fue la especie más eficaz a ambas temperaturas y tan solo en el caso de *B. nigra* la inactivación a 25 °C fue significativamente mayor que a 20 °C. Dado que las densidades de inóculo empleadas en los ensayos son muy superiores a las detectadas habitualmente en suelos naturales (Nash y Snyder, 1965; Tello y Lacasa, 1990; Vázquez, 1990; Rodríguez-Molina, 1996), los resultados obtenidos sugieren que la biofumigación con las especies de *Brassicaceae* ensayadas, podría ser una estrategia de control de la fusariosis vascular del tabaco eficaz por si misma, sin necesidad de combinarla con solarización. Son necesarios ensayos en condiciones de campo, en suelos naturalmente infectados con *F. oxysporum* f. sp. *batatas*, para confirmar la eficacia real de la biofumigación.

En el caso de *P. nicotianae* la inactivación a 25 °C fue significativamente mayor que a 20 °C para las tres especies de *Brassicaceae*. *S. alba* fue la especie menos efectiva a ambas temperaturas, mientras que a 25 °C se llegó a la inactivación del 100 % del inóculo con *B. nigra* y *C. bursa-pastoris*. Por tanto, aunque a ambas temperaturas hay liberación de volátiles, los compuestos liberados por las tres especies a 25 °C son más eficaces en la inactivación, probablemente porque sea mayor la cantidad liberada a esta temperatura.

Las diferencias de eficacia detectadas entre las especies de *Brassicaceae* pueden estar asociadas al estado fenológico en que se encontraban las plantas

utilizadas en el ensayo. *S. alba* presentaba un estado 3.0, *B. nigra* 4.4 y *C. bursa-pastoris* 4.5. Los niveles de glucosinolatos y los compuestos relacionados varían durante el desarrollo de la planta y entre los tejidos de la planta (Clossais-Besnard y Larher, 1991; Rosa *et al.*, 1996).

### **B. Ensayo en condiciones de temperatura fluctuante con especies de *Brassicaceae*. Condiciones de biosolarización y biofumigación en Murcia y Extremadura**

Con este ensayo se pretendía indagar más sobre las condiciones reales de las técnicas de biofumigación y biosolarización en Murcia y Extremadura para el control de *P. nicotianae* en campo. Para ello, se estudió la inactivación de las clamidosporas de *P. nicotianae* (500 clamidosporas·g<sup>-1</sup> de tierra.) por el efecto de varias especies de *Brassicaceae* ensayadas en diferentes regímenes de temperatura fluctuantes.

Se ensayaron tres regímenes de temperaturas diarias fluctuantes durante 14 días. Para establecer estos regímenes se emplearon los datos de las temperaturas registradas en el suelo en ensayos previos de biofumigación realizados en Extremadura y en Murcia en 2008 y 2009, respectivamente. El cálculo de los diferentes regímenes se hizo estableciendo intervalos de 2,5 °C entre los valores mínimos y máximos de temperatura registradas por las sondas. Por cada intervalo de temperatura fijado se calculó el número de horas acumuladas en todo el periodo estudiado y se relativizaron a día de 24 horas.

Se establecieron tres regímenes de temperaturas fluctuantes diarias:

- **T1** (temperaturas elevadas): **4 h a 30 °C, 8 h a 33 °C, 8 h a 37 °C y 4 h a 40 °C**. Corresponde a las condiciones de biosolarización con estiércol fresco de oveja en invernadero en Murcia en el mes de agosto.
- **T2** (temperaturas intermedias): **4 h a 27 °C, 12 h a 30 °C y 8 h a 33 °C**. Corresponde a las condiciones de biosolarización con vinaza de remolacha en invernadero en Murcia en el mes de agosto.

- **T3** (temperaturas bajas): **7,5 h a 14 °C, 12 h a 16 °C y 4,5 h a 19 °C**. Corresponde a las condiciones de biofumigación con especies de *Brassicaceae* en marzo al aire libre en Extremadura.

El material biofumigante empleado fue la parte aérea (tallos, hojas, flores y silicuas) de 5 especies de *Brassicaceae*: *B. nigra*, *S. alba*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *B. carinata* y *C. bursa-pastoris*. El estado fenológico de las plantas en el momento de realizar el ensayo fue, según las claves de Berkenkamp (1973): 4.0 (semillas en las silicuas inferiores de los racimos completamente llenas, transparentes) en *B. nigra*, 3.3 (silículas inferiores de los racimos empezándose a llenar) en *S. alba*, 2.4 (botones florales amarilleando) en *B. carinata* y 5.0 (silículas marrones y quebradizas; tallos secos) en *C. bursa-pastoris*. En *B. oleracea* el estado fenológico correspondía al de la recolección comercial.

### **B.1. Resultados**

#### a) Régimen de temperaturas elevadas (T1).

En T1 las cinco especies biofumigantes inactivaron totalmente el inóculo, pero en el testigo no biofumigado hubo una supervivencia del 11 % ( $55 \pm 55$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra).

#### b) Régimen de temperaturas medias (T2).

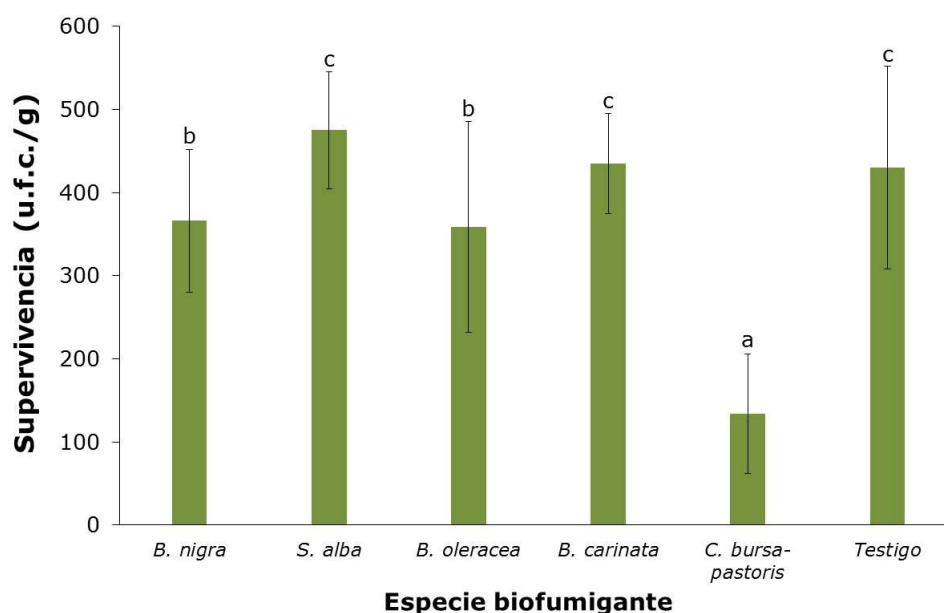
En T2 la inactivación del inóculo fue total con todos los biofumigantes, excepto con *B. carinata*, con una supervivencia del 51 % del inóculo ( $257 \pm 132$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra); en el testigo la supervivencia fue del 73 % ( $365 \pm 189$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra).

#### c) Régimen de temperaturas bajas (T3).

En T3 ninguna especie biofumigante inactivó totalmente el inóculo, aunque para todos los biofumigantes, incluyendo el testigo, se produjo inactivación de parte de este.



Para el estudio del efecto de la especie biofumigante se realizó un análisis de la varianza con un factor fijo (biofumigante) para el régimen de temperaturas bajas (T3). Para este análisis se emplearon los datos de las densidades de inóculo (u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra) al finalizar el ensayo y se incluyeron también los testigos. Los resultados indicaron que existían diferencias significativas entre especies biofumigantes ( $F=99,65$ ;  $P<0,05$ ), y por ello, se realizó un test de comparación de medias de Tukey. Se diferenciaron significativamente ( $P<0,05$ ) tres grupos homogéneos (Figura 2.13) lo que permitió ordenar los biofumigantes de menor a mayor supervivencia mostrada: *C. bursa-pastoris* > *B. nigra* = *B. oleracea* > *S. alba* = *B. carinata* = Testigo.



**Figura 2.13.** Supervivencia (u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra  $\pm$  desviación estándar) del inóculo de *P. nicotianae* sometido al efecto de las especies biofumigantes para el régimen de temperaturas bajas (T3). Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P>0,05$ ).

Para evaluar únicamente el efecto de la temperatura, se realizó un análisis de la varianza con un factor fijo (temperatura) en la supervivencia del inóculo de los testigos. Se realizó un análisis de la varianza con un factor fijo (temperatura) para estudiar el efecto del régimen de temperatura en la supervivencia del inóculo de los testigos. La supervivencia del inóculo presentó diferencias significativas ( $F=68,04$ ;  $P<0,05$ ) entre regímenes de temperaturas y el test de comparaciones

múltiples de Tukey permitió diferenciar significativamente ( $P < 0,05$ ) dos grupos homogéneos: la supervivencia del inóculo en el régimen de temperaturas elevadas (T1) ( $55 \pm 55$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra) fue significativamente menor que en el de temperaturas medias (T2) ( $257 \pm 132$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra) y bajas (T3) ( $435 \pm 127$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra).

## B.2. Discusión

La inactivación del inóculo de *P. nicotianae* se vio influenciada por el efecto de las distintas especies de *Brassicaceae* y los diferentes regímenes de temperatura fluctuantes ensayados.

Los resultados del estudio en condiciones de temperatura fluctuante ponen claramente de manifiesto el efecto de las elevadas temperaturas en la inactivación del inóculo de *P. nicotianae*. Este ensayo se realizó en unas condiciones más próximas a las de campo, tanto por el tipo de inóculo empleado como por los regímenes de temperatura seleccionados. Las cinco especies ensayadas como biofumigantes solo inactivaron totalmente las clamidosporas de *P. nicotianae* cuando se combinaron con temperaturas fluctuantes diarias relativamente elevadas, correspondientes a condiciones de biosolarización con estiércol fresco de oveja en invernadero en el mes de agosto en Murcia (T1). En el régimen de temperaturas intermedias (T2) todas las especies biofumigantes inactivaron totalmente el inóculo excepto *B. carinata*. Sin embargo, en el régimen de temperaturas bajas (T3) ninguna de las especies ensayadas como biofumigante inactivó totalmente el inóculo. Por tanto, la temperatura es un factor relevante en la inactivación del inóculo.

La supervivencia del inóculo en los testigos de los regímenes de temperatura T1, T2 y T3 permite estimar el efecto de la temperatura por sí misma en la inactivación del inóculo. Así, mientras que en el régimen de temperaturas bajas (T3) sobrevivió el 86 % del inóculo, en el de temperaturas intermedias (T2) disminuyó hasta el 73 %, reduciéndose hasta el 11 % en el de temperaturas elevadas (T3). Barbercheck y Von Broembsen (1986) describen la inactivación de

clamidosporas de dos aislados de *P. cinnamomi* cuando son expuestos a 38 °C durante 30 minutos o a 44 °C durante 10 minutos. Juárez-Palacios *et al.* (1991) demostraron que exposiciones de 20 minutos a 45 °C resultaron letales para los propágulos de *Phytophthora cinnamomi* (principalmente clamidosporas) y de un aislado de *P. megasperma* (principalmente oosporas), mientras que exposiciones de 30 minutos a 45 °C fueron necesarias para inactivar todos los propágulos de *P. cactorum*, pero resultaron insuficientes para inactivar otro aislado de *P. megasperma*.

Coelho *et al.* (2000) realizaron un trabajo sobre los efectos de la temperatura y el tiempo en la supervivencia de las clamidosporas de *P. nicotianae*, concluyendo que los modelos matemáticos que mejor describen la supervivencia son lineal-exponencial o exponencial. Sin embargo, cuando se trata de regímenes de temperaturas fluctuantes en lugar de temperaturas constantes no hay un modelo único que describa adecuadamente los cambios de supervivencia.

La comparación de las inactivaciones de inóculo conseguidas en las condiciones de temperaturas fluctuantes T1, T2 y T3 evidencia las ventajas de combinar la biofumigación con la solarización, es decir, de la biosolarización. Se ha ensayado en numerosos estudios la combinación de la biofumigación con la solarización, mostrándose más eficaz en la disminución de hongos fitopatógenos del suelo (Katan, 1980). Los propágulos son debilitados por el calor (Freeman y Katan, 1988) y se hacen más vulnerables a los fumigantes del suelo, a otros organismos, o a cambios en la atmósfera del suelo (Stapleton y DeVay, 1982). Horiuchi *et al.* (1982) observaron que la eficacia de la solarización es mayor cuando se incorporan abonos verdes de nabo. Munnecke (1984) señala que la solarización es eficaz en el control de *F. oxysporum*, cuando se añaden coles, debido a los gases fitotóxicos que se producen en su descomposición. Ploeg *et al.* (2001) indicaron que las altas temperaturas acentúan el efecto de la biofumigación al aumentar la liberación de sustancias volátiles. Gamliel y Stapleton (1993) estudiaron la inactivación de *P. ultimum* y *S. rolfii* en suelos

biofumigados con col expuestos 4 días a regímenes de 38 ó 45 °C durante 4 h·día<sup>-1</sup> y a 30 °C el resto del día, mientras que en suelos no biofumigados se recuperaron propágulos de estos patógenos. Coelho *et al.* (2000) señalaron, que el tiempo necesario, en condiciones controladas, para la inactivación de las clamidosporas de *P. nicotianae* disminuye cuando se añaden al suelo fragmentos triturados de hojas de col tanto con regímenes de temperatura constante como fluctuantes. Ensayaron regímenes de temperaturas fluctuantes (similares a los periodos óptimos de solarización) de 5 h·día<sup>-1</sup> a 44 °C y el resto del día a 25 °C durante 6 días, reduciéndose el inóculo a 0,4 u.f.c.·g<sup>-1</sup> de suelo, y en tan solo 2 días de exposición a un régimen de 3 h·día<sup>-1</sup> a 47 °C y el resto del día a 25 °C la población se redujo a 1 u.f.c.·g<sup>-1</sup> de suelo.

En las condiciones de temperaturas fluctuantes diarias bajas (T3), correspondientes a Extremadura en el mes de marzo al aire libre, las especies ensayadas solo inactivaron un porcentaje bajo de las clamidosporas. En esas condiciones las especies difirieron en su eficacia como biofumigantes, siendo *C. bursa-pastoris* la especie que inactivó el 73 % del inóculo, y le siguieron *B. nigra* y *B. oleracea*. Sin embargo, *B. carinata* y *S. alba* no inactivaron el inóculo.

En el estudio de los regímenes de temperatura fluctuantes T1, T2 y T3, las especies biofumigantes de mayor inactivación tenían semillas en las silicuas (*C. bursa-pastoris* y *B. nigra*), en cambio las de menor inactivación no presentaban flores (*B. carinata*) o las silicuas aún no habían comenzado a llenarse (*S. alba*). La inactivación variable del inóculo por las distintas especies biofumigantes se fundamenta en el perfil de glucosinolatos que posee cada especie y en el estado fenológico de la planta en el momento del ensayo. La distribución de glucosinolatos en las partes de las plantas varía con la edad de planta y especie (Bellostas *et al.*, 2004).

### **C. Ensayo en condiciones de temperatura constante con pellets de *B. carinata* a diferentes tiempos de exposición**

Los experimentos anteriores habían demostrado la efectividad de los pellets de *B. carinata* (BioFence®) así como la influencia de la temperatura en el descenso de la supervivencia de los propágulos fúngicos. Por este motivo el siguiente paso fue estudiar el efecto de pellets de *B. carinata* a temperaturas costantes en la inactivación de varios tipos de inóculo y diferentes densidades: 1) triturado miceliar de *P. nicotianae* (500 u.f.c.·g<sup>-1</sup>); 2) clamidosporas de *P. nicotianae* a una densidad de 500 u.f.c.·g<sup>-1</sup> de tierra; 3) inóculo-talco de *F. oxysporum* a 10<sup>5</sup> u.f.c. g<sup>-1</sup> de tierra.

Se ensayaron dos condiciones de temperatura constante, 25 °C y 30 °C, a diferentes tiempos de exposición: 0 horas, 24 horas, 72 horas, 7 días y 14 días.

Como material biofumigante se emplearon pellets de *B. carinata* (BioFence®), previamente triturados en un mortero de porcelana. Se introdujo la cantidad de 0,08 g de BioFence®.

Los porcentajes de inactivación del inóculo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* fueron calculados respecto al testigo para cada temperatura y tiempo de exposición.

Anterior a este ensayo, se había realizado un estudio sobre la inactivación de las clamidosporas de *P. nicotianae* por los compuestos volátiles liberados por los pellets (6 g de BioFence®) a 25 °C a diferentes tiempos: 24 h, 48 h y 72 h. La inactivación fue del 100 % para todos los tiempos estudiados, por lo que se decidió reducir la dosis empleada.

#### **C.1. Resultados**

**a. Efecto de la temperatura constante y de los pellets de *B. carinata* en la inactivación del inóculo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* a diferentes tiempos de exposición**

Los pellets de *B. carinata* inactivaron el inóculo de las dos especies fúngicas estudiadas, *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. Los resultados de la inactivación del inóculo fueron diferentes para las dos especies fúngicas, temperaturas y tiempos de exposición.

El análisis de la varianza con tres factores fijos (especie de hongo, temperatura y tiempo de exposición) se muestra en la Tabla 2.14. Los resultados mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de inactivación entre especies fúngicas, temperaturas y tiempos de exposición. Además, todas las interacciones estudiadas fueron significativas.

**Tabla 2.14.** Efecto de la especie de hongo (E), temperatura ( $T^a$ ) y tiempo de exposición (T) y las interacciones especie de hongo x temperatura ( $ExT^a$ ), especie de hongo x tiempo ( $ExT$ ), temperatura x tiempo ( $T^a \times T$ ) y especie de hongo x temperatura x tiempo ( $ExT^a \times T$ ) en la inactivación del inóculo. ANOVA con tres factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Especie de hongo (E)	26,56	1	26,56	545,84	0,00
Temperatura ( $T^a$ )	17,23	1	17,23	354,09	0,00
Tiempo (T)	2,20	3	0,73	15,07	0,00
$ExT^a$	7,76	1	7,76	159,36	0,00
$ExT$	1,24	3	0,41	8,51	0,00
$T^a \times T$	25,17	3	8,39	172,43	0,00
$ExT^a \times T$	3,55	3	1,18	24,30	0,00
Residuos	33,19	682	0,05		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Dada la existencia de diferencias significativas entre los factores estudiados, se estudió la influencia de la temperatura y del tiempo de exposición para cada especie de hongo.

Para la especie *F. oxysporum*, el análisis de la varianza a dos vías (temperatura y tiempo) mostró diferencias significativas de inactivación del

inóculo para la temperatura y el tiempo pero la interacción de ambos factores no fue significativa (Tabla 2.15).

**Tabla 2.15.** Efecto de la temperatura ( $T^a$ ) y tiempo de exposición (T) y la interacción temperatura x tiempo ( $T^a \times T$ ) en la inactivación del inóculo-talco de *F. oxysporum*. ANOVA con dos factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Temperatura ( $T^a$ )	0,95	1	0,94	15,5	0,00
Tiempo (T)	1,60	3	0,53	8,75	0,00
$T^a \times T$	0,12	3	0,04	0,67	0,58
Residuos	6,10	100	0,06		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Posteriormente, se realizaron ANOVAs a una vía para los factores temperatura y tiempo.

El ANOVA a una vía (temperatura) mostró diferencias de inactivación entre temperaturas ( $F=12,81$ ;  $P<0,05$ ). La inactivación a 30 °C ( $20,48 \pm 26,08$  %) fue significativamente menor que a 25 °C ( $37,61 \pm 24,40$  %).

El ANOVA a una vía (tiempo) presentó diferencias de inactivación entre los tiempos de exposición ensayados ( $F=8,64$ ;  $P<0,05$ ). Posteriormente, el test de comparaciones múltiples agrupó los tiempos en tres grupos homogéneos; la inactivación promedio ( $\pm$  desviación estándar) a las 24 horas fue de  $34,16 \pm 18,84$  % **ab**; a las 48 horas igual a  $43,25 \pm 22,22$  % **a**; a los 7 días fue de  $29,89 \pm 20,13$  % **b**; y a los 14 días igual a  $10,22 \pm 32,78$  % **c**. La inactivación más elevada del inóculo de *F. oxysporum* se produjo cuando el inóculo estuvo expuesto a los compuestos volátiles liberados por los pellets durante 48 horas.

Con respecto a la especie *P. nicotianae*, se realizó un análisis de varianza a tres vías (tipo de inóculo, temperatura y tiempo de exposición) que se presenta en la Tabla 2.16. Los resultados mostraron diferencias significativas de inactivación entre tipos de inóculo, temperatura y tiempos de exposición, además, todas las interacciones fueron significativas. Dados estos resultados, se



estudió para cada temperatura el efecto del tipo de inóculo, tiempo de exposición e interacción de ambos factores (Tabla 2.17).

**Tabla 2.16.** Efecto del tipo de inóculo de *P. nicotianae* (I), temperatura ( $T^a$ ) y tiempo de exposición (T) y las interacciones tipo de inóculo x temperatura ( $I \times T^a$ ), tipo de inóculo x tiempo ( $I \times T$ ), temperatura x tiempo ( $T^a \times T$ ) y tipo de inóculo x temperatura x tiempo ( $I \times T^a \times T$ ) en la inactivación. ANOVA con tres factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Inóculo (I)	3,70	1	3,70	149,28	0,00
Temperatura ( $T^a$ )	25,33	1	25,33	1021,27	0,00
Tiempo (T)	1,44	3	0,48	19,35	0,00
$I \times T^a$	0,49	1	0,49	19,64	0,00
$I \times T$	3,18	3	1,06	42,75	0,00
$T^a \times T$	29,14	3	9,71	391,60	0,00
$I \times T^a \times T$	4,05	3	1,35	54,48	0,00
Residuos	14,24	574	0,03		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad

**Tabla 2.17.** Efecto del tipo de inóculo (I), tiempo de exposición (T) y la interacción tipo de inóculo x tiempo ( $I \times T$ ), en la inactivación de *P. nicotianae* a las dos temperaturas ensayadas. ANOVAs con dos factores fijos.

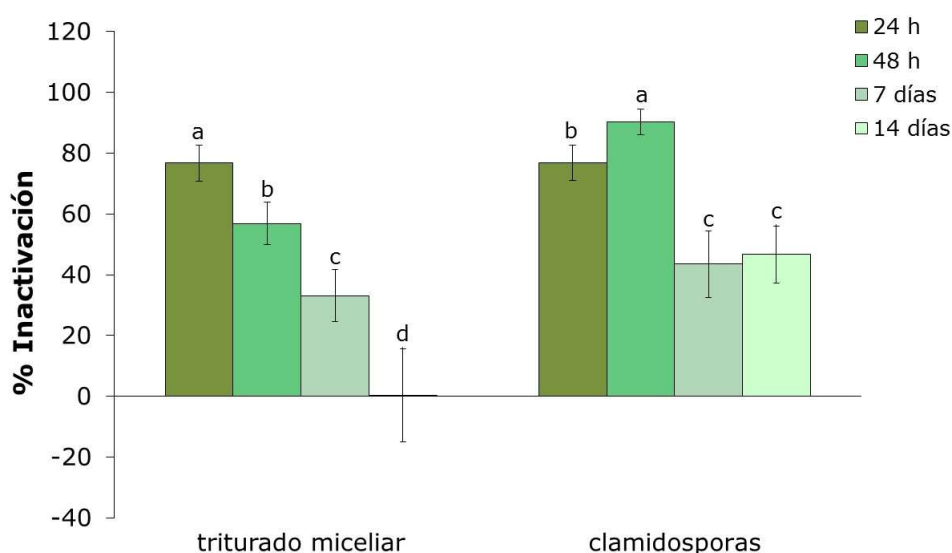
Temperatura( $T^a$ )	Fuente	SC	gl	CM	F	P
25 °C	Inóculo (I)	4,02	1	4,02	375,00	0,00
	Tiempo (T)	20,59	3	6,87	640,90	0,00
	$I \times T$	3,82	3	1,27	118,70	0,00
	Residuos	3,01	282	0,01		
30 °C	Inóculo (I)	1,17	1	1,17	30,41	0,00
	Tiempo (T)	11,01	3	3,67	95,50	0,00
	$I \times T$	2,44	3	0,81	21,19	0,00
	Residuos	11,22	292	0,04		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Los resultados de los ANOVAs presentados en la Tabla 2.17 mostraron que para las dos temperaturas ensayadas fue significativo el efecto del tipo de inóculo, tiempo de exposición y la interacción de ambos factores. Posteriormente, se estudió la interacción para cada temperatura.

Para el estudio de la interacción a 25 °C se realizaron los correspondientes ANOVAs a una vía.

Los ANOVAs a una vía (tipo de inóculo) mostraron diferencias significativas de inactivación entre los tiempos de exposición para el inóculo triturado-miceliar ( $F=394,42$ ;  $P<0,05$ ) y el inóculo-clamidosporas ( $F=368,88$ ;  $P<0,05$ ). A continuación, se realizó el test de comparaciones múltiples para cada tipo de inóculo. Con respecto al inóculo triturado miceliar se diferenciaron cuatro grupos homogéneos y tres para el inóculo clamidosporas (Figura 2.14).



**Figura 2.14.** Inactivación del inóculo triturado miceliar y clamidosporas de *P. nicotianae* (%  $\pm$  desviación estándar) producido por los pellets de *B. carinata* a 24 h, 48 h, 7 días y 14 días a la temperatura de 25 °C. Para cada tipo de inóculo, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P>0,05$ ).

La inactivación del inóculo-triturado miceliar fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo en el que el inóculo estuvo expuesto al material biofumigante, siendo máxima la inactivación a 24 horas y mínima o inexistente a los 14 días. Sin embargo, para las clamidosporas la inactivación fue máxima a 48 horas, se observó un descenso de la inactivación conforme aumentó el tiempo de exposición del inóculo frente al material biofumigante.

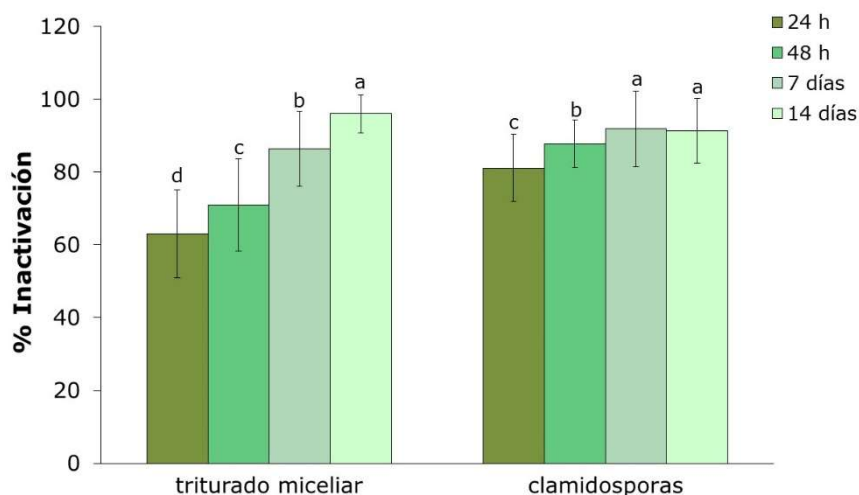
Los ANOVAs a una vía (tiempo de exposición) mostraron diferencias significativas de inactivación entre los dos tipos de inóculo para todos los tiempos excepto para el tiempo 24 horas (Tabla 2.18). A 25 °C, el inóculo-clamidosporas presentó una inactivación mayor que el triturado miceliar para todos los tiempos, salvo a 24 horas que no presentó diferencias de inactivación con respecto al triturado miceliar.

**Tabla 2.18.** Efecto del tipo de inóculo (I) en la inactivación de *P. nicotianae* por los pellets de *B. carinata* a los tiempos de exposición 24 h, 48 h, 7 días y 14 días a la temperatura de 25 °C. ANOVAs con un factor fijo.

<b>Tiempo (T)</b>	<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>24 h</b>	Inóculo (I)	0,00	1	0,00	0,02	0,89
	Residuos	0,65	78	0,01		
<b>48 h</b>	Inóculo (I)	5,62	1	5,62	663,50	0,00
	Residuos	0,66	78	0,01		
<b>7 días</b>	Inóculo (I)	0,27	1	0,27	22,29	0,00
	Residuos	0,93	78	0,01		
<b>14 días</b>	Inóculo (I)	2,84	1	2,84	175,40	0,00
	Residuos	0,76	48	0,02		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

De igual manera, se estudió la interacción tipo de inóculo x tiempo de exposición a 30 °C. Para ello, se hicieron ANOVAs a una vía (tipo de inóculo) que indicaron la existencia de diferencias significativas de inactivación del triturado miceliar ( $F=101,25$ ;  $P<0,05$ ) y de las clamidosporas ( $F=16,78$ ;  $P<0,05$ ) para los tiempos de exposición. Posteriormente, se compararon las medias mediante el test de Tukey, diferenciándose tres y cuatro grupos homogéneos para las clamidosporas y triturado miceliar, respectivamente (Figura 2.15).



**Figura 2.15.** Inactivación del inóculo triturado miceliar y clamidosporas de *P. nicotianae* (%  $\pm$  desviación estándar) producido por los pellets de *B. carinata* a 24 h, 48 h, 7 días y 14 días a la temperatura de 30 °C. Para cada tipo de inóculo, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P > 0,05$ ).

En general, para ambos tipos de inóculo de *P. nicotianae* la inactivación fue mayor conforme aumentó el tiempo de exposición a los compuestos liberados por el material biofumigante (Figura 2.15). A 30 °C, se alcanzó el máximo de inactivación a los 14 días para el triturado miceliar, mientras que para las clamidosporas no hubo diferencias significativas de inactivación entre los tiempos 7 y 14 días.

**Tabla 2.19.** Efecto del tipo de inóculo (I) en la inactivación de *P. nicotianae* por los pellets de *B. carinata* a los tiempos de exposición 24 h, 48 h, 7 días y 14 días a la temperatura de 30 °C. ANOVAs con un factor fijo.

Tiempo (T)	Fuente	SC	gl	CM	F	P
<b>24 h</b>	Inóculo (I)	1,45	1	1,45	60,43	0,00
	Residuos	1,87	78	0,02		
<b>48 h</b>	Inóculo (I)	1,56	1	1,56	61,66	0,00
	Residuos	1,98	78	0,03		
<b>7 días</b>	Inóculo (I)	0,61	1	0,61	10,17	0,00
	Residuos	4,05	68	0,06		
<b>14 días</b>	Inóculo (I)	0,52	1	0,52	10,62	0,00
	Residuos	3,32	68	0,05		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Los ANOVAs a una vía (tiempo de exposición) mostraron diferencias significativas de inactivación entre los dos tipos de inóculo de *P. nicotianae* (clamidosporas y triturado miceliar) para todos los tiempos de exposición (Tabla 2.19). A 30 °C, la inactivación de *P. nicotianae* fue significativamente mayor en las clamidosporas que en el triturado miceliar a 24 h, 48 h y 7 días. Solamente la inactivación por los pellets fue superior en el triturado miceliar respecto de las clamidosporas en el tiempo 14 días.

### **b. Efecto de la temperatura constante en la supervivencia del inóculo en los testigos de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* a diferentes tiempos de exposición**

En este ensayo los datos relativos a los testigos a 0h, 24 h, 48 h, 7 y 14 días nos permitía evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de exposición en la supervivencia del inóculo. Por ello, se realizó un análisis de la varianza a dos vías (temperatura y tiempo de exposición) para estudiar el efecto de estos factores en la supervivencia del inóculo de los testigos de las dos especies fúngicas.

#### **1. Inóculo-talco de *F. oxysporum***

La supervivencia del inóculo-talco en los testigos solamente presentó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tiempos de exposición (Tabla 2.20).

**Tabla 2.20.** Efecto de la temperatura ( $T^a$ ) y el tiempo de exposición (T) en la supervivencia del inóculo-talco en los testigos de *F. oxysporum*. ANOVA con dos factores fijos.

<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Temperatura ( $T^a$ )	$1,01 \cdot 10^7$	1	$1,01 \cdot 10^7$	0,27	0,60
Tiempo (T)	$6,50 \cdot 10^8$	4	$1,62 \cdot 10^8$	4,32	0,00
$T^a \times T$	$1,08 \cdot 10^7$	4	$2,70 \cdot 10^7$	0,72	0,58
Residuos	$5,38 \cdot 10^9$	143	$3,76 \cdot 10^7$		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

El test de comparaciones múltiples de Tukey permitió diferenciar significativamente ( $P<0,05$ ) dos grupos homogéneos entre los tiempos de exposición, la supervivencia promedio  $\pm$  desviación estándar a 0 h fue de  $13.910 \pm 6.271$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra **ab**; 24 horas:  $16.251 \pm 6.842$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra **b**; 48 horas:  $16.572 \pm 5.223$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra **b**; 7 días :  $13.988 \pm 3.946$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra **ab**; 14 días:  $10.899 \pm 7.426$  u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup> de tierra **a**. De acuerdo a estos resultados, la supervivencia del inóculo-talco de *F. oxysporum* a los 14 días fue significativamente menor que a 24 y 48 horas.

## 2. Triturado micelar de *P. nicotianae*

Al estudiar el efecto de la temperatura y tiempo de exposición en la supervivencia del inóculo-triturado micelar en los testigos de *P. nicotianae* se observaron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) de supervivencia entre temperaturas y tiempos de exposición, además la interacción de ambos factores fue significativa (Tabla 2.21).

**Tabla 2.21.** Efecto de la temperatura (T<sup>a</sup>) y el tiempo de exposición (T) en la supervivencia del inóculo-triturado micelar en los testigos de *P. nicotianae*. ANOVA con dos factores fijos.

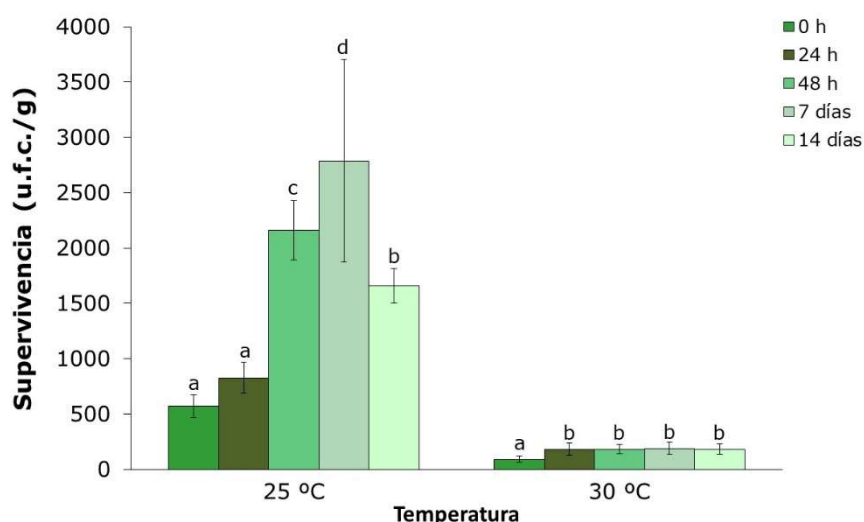
Fuente	SC	gl	CM	F	P
Temperatura (T <sup>a</sup> )	$1,94 \cdot 10^8$	1	$1,94 \cdot 10^8$	1882,10	0,00
Tiempo (T)	$6,85 \cdot 10^7$	4	$1,71 \cdot 10^7$	166,00	0,00
T <sup>a</sup> xT	$5,70 \cdot 10^7$	4	$1,42 \cdot 10^7$	138,20	0,00
Residuos	$3,69 \cdot 10^7$	358	$1,03 \cdot 10^5$		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Dado que la interacción temperatura x tiempo de exposición fue significativa ( $P<0,05$ ) se estudió por separado cada uno de los factores. Para ello se realizó un ANOVA con un factor fijo (tiempo de exposición) para cada temperatura. Los resultados indicaron la existencia de diferencias en la supervivencia del inóculo-triturado micelar entre los tiempos de exposición para la temperatura de 25 °C ( $F=148,30$ ;  $P<0,05$ ) y 30 °C ( $F=31,27$ ;  $P<0,05$ ). Se realizó un test de comparaciones múltiples de Tukey para cada una de las

temperaturas; a 25 °C se diferenciaron 4 grupos homogéneos y a 30 °C solamente dos (Figura 2.16).

A 25 °C la supervivencia del inóculo fue máxima a los 7 días y mínima a 0 h, mientras que a 30 °C la supervivencia fue mínima a 0 h y para el resto de tiempos no hubo diferencias significativas de supervivencia (Figura 2.16).



**Figura 2.16.** Supervivencia del inóculo-triturado miceliar en los testigos de *P. nicotianae* (u.f.c. $\cdot$ g<sup>-1</sup>  $\pm$  desviación estándar) a 0 h, 24 h, 48 h, 7 días y 14 días bajo las temperaturas de 25 °C y 30 °C. Para cada temperatura, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P > 0,05$ ).

Además, para cada tiempo de exposición se realizó un ANOVA con un factor fijo (temperatura) y los resultados se recogen en la Tabla 2.22. Para todos los tiempos de exposición las diferencias de supervivencia del inóculo entre temperaturas fueron significativas ( $P < 0,05$ ) (Tabla 2.22). La supervivencia del inóculo del triturado-miceliar en los testigos de *P. nicotianae* fue significativamente mayor a 25 °C que a 30 °C para todos los tiempos de exposición.



**Tabla 2.22.** Efecto de la temperatura ( $T^a$ ) en la inactivación del inóculo-triturado miceliar de *P. nicotianae* a los tiempos de exposición de 0 h, 24 h, 48 h, 7 días y 14 días. ANOVAs con un factor fijo.

Tiempo (T)	Fuente	SC	gl	CM	F	P
<b>0 h</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$4,51 \cdot 10^6$	1	$4,51 \cdot 10^6$	782,20	0,00
	Residuos	$4,44 \cdot 10^5$	77	$5,77 \cdot 10^3$		
<b>24 h</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$7,11 \cdot 10^6$	1	$7,11 \cdot 10^6$	725,30	0,00
	Residuos	$6,67 \cdot 10^5$	68	$9,81 \cdot 10^3$		
<b>48 h</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$6,71 \cdot 10^7$	1	$6,71 \cdot 10^7$	2123,00	0,00
	Residuos	$2,14 \cdot 10^6$	68	$3,16 \cdot 10^4$		
<b>7 días</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$1,16 \cdot 10^8$	1	$1,16 \cdot 10^8$	241,00	0,00
	Residuos	$3,26 \cdot 10^7$	68	$4,80 \cdot 10^5$		
<b>14 días</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$4,29 \cdot 10^7$	1	$4,29 \cdot 10^7$	3221,00	0,00
	Residuos	$1,02 \cdot 10^7$	77	$1,33 \cdot 10^4$		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

### 3. Clamidosporas de *P. nicotianae*

Al igual que para el triturado miceliar, la supervivencia del inóculo-clamidosporas de *P. nicotianae* mostró diferencias significativas de supervivencia entre temperaturas y tiempos de exposición, también la interacción de ambos factores fue significativa (Tabla 2.23).

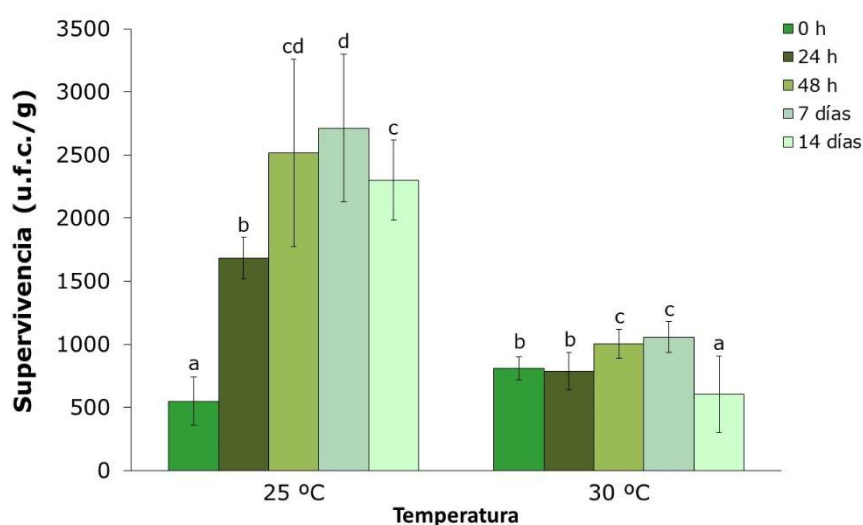
**Tabla 2.23.** Efecto de la temperatura ( $T^a$ ) y el tiempo de exposición (T) en la supervivencia del inóculo-clamidosporas en los testigos de *P. nicotianae*. ANOVA con dos factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Temperatura ( $T^a$ )	$1,06 \cdot 10^8$	1	$1,06 \cdot 10^8$	870,10	0,00
Tiempo (T)	$7,29 \cdot 10^7$	4	$1,82 \cdot 10^7$	149,30	0,00
$T^a \times T$	$5,19 \cdot 10^7$	4	$1,30 \cdot 10^7$	106,30	0,00
Residuos	$4,51 \cdot 10^7$	369	$1,22 \cdot 10^5$		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Para el estudio de la interacción temperatura x tiempo se analizó por separado cada uno de los factores, realizándose un ANOVA con un factor fijo (tiempo de exposición) para cada temperatura. Como en el inóculo-triturado miceliar, la supervivencia del inóculo-clamidosporas mostró diferencias

significativas entre los tiempos de exposición para la temperatura de 25 °C ( $F=133,20$ ;  $P<0,05$ ) y 30 °C ( $F=43,70$ ;  $P<0,05$ ). Posteriormente, para cada una de las temperaturas se diferenciaron varios grupos homogéneos entre los tiempos de exposición de acuerdo al test de Tukey (Figura 2.17). A 25 °C la supervivencia fue máxima a los 7 días y mínima a las 0 h, mientras que a 30 °C la supervivencia fue máxima a los 7 días y mínima a los 14 días.



**Figura 2.17.** Supervivencia del inóculo-clamidosporas en los testigos de *P. nicotianae* ( $\text{u.f.c.} \cdot \text{g}^{-1} \pm$  desviación estándar) a 0 h, 24 h, 48 h, 7 días y 14 días incubados a las temperaturas de 25 °C y 30 °C. Para cada temperatura, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Test de Tukey,  $P>0,05$ ).

Asimismo, para cada tiempo de exposición se realizó un ANOVA considerando la temperatura como factor fijo (Tabla 2.24). Según los resultados recogidos en la Tabla 2.23, el inóculo mostró diferencias de supervivencia entre las temperaturas (25 °C y 30 °C) para todos los tiempos de exposición. La supervivencia del inóculo-clamidosporas en los testigos de *P. nicotianae* fue significativamente mayor a 25 °C que a 30 °C para todos los tiempos de exposición excepto para el tiempo 0 h.

**Tabla 2.24.** Efecto de la temperatura ( $T^a$ ) en la inactivación del inóculo-clamidosporas de *P. nicotianae* a los tiempos de exposición de 0 h, 24 h, 48 h, 7 días y 14 días. ANOVAs con un factor fijo.

Tiempo (T)	Fuente	SC	gl	CM	F	P
<b>0 h</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$1,33 \cdot 10^6$	1	$1,33 \cdot 10^6$	60,86	0,00
	Residuos	$1,71 \cdot 10^6$	78	$2,20 \cdot 10^4$		
<b>24 h</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$1,60 \cdot 10^8$	1	$1,60 \cdot 10^8$	651,00	0,00
	Residuos	$1,92 \cdot 10^6$	78	$2,46 \cdot 10^4$		
<b>48 h</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$4,58 \cdot 10^7$	1	$4,58 \cdot 10^7$	162,10	0,00
	Residuos	$2,20 \cdot 10^7$	78	$2,83 \cdot 10^5$		
<b>7 días</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$5,49 \cdot 10^7$	1	$5,49 \cdot 10^7$	306,00	0,00
	Residuos	$1,40 \cdot 10^7$	78	$1,79 \cdot 10^5$		
<b>14 días</b>	Temperatura ( $T^a$ )	$3,80 \cdot 10^7$	1	$3,80 \cdot 10^7$	401,50	0,00
	Residuos	$5,40 \cdot 10^6$	57	$9,47 \cdot 10^4$		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

## C.2. Discusión

Los resultados de este último ensayo demostraron el efecto de los pellets de *B. carinata* (BioFence®) en la inactivación del inóculo de *P. nicotianae* (triturado miceliar y clamidosporas) e inóculo-talco de *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*.

En la literatura científica se han encontrado referencias sobre la inactivación de diferentes estructuras fúngicas por compuestos volátiles liberados por tejidos de especies de *Brassicaceae*. Asimismo, se ha descrito el papel de los pellets de *B. carinata* (BioFence®) en la inhibición de la germinación de clamidosporas y zoosporas de *P. cinnamomi* (Morales-Rodríguez *et al.*, 2016), clamidosporas de *P. nicotianae* (Serrano-Pérez *et al.*, 2017), conidias de *Fusarium circinatum* (Morales-Rodríguez *et al.*, 2018) y esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Warmington y Clarkson, 2016).

En este ensayo se observaron diferencias en la supervivencia del inóculo de los testigos en función de la temperatura, tiempo de exposición y de la especie de hongo.

Las dos temperaturas seleccionadas para realizar los ensayos (25 y 30 °C) influyeron de forma significativa en la supervivencia del inóculo de los testigos no biofumigados de *P. nicotianae*. En general, la supervivencia del inóculo (triturado miceliar y clamidosporas) de los testigos fue significativamente mayor a 25 °C que a 30 °C para todos los tiempos estudiados. A 25 °C se observó un incremento de la densidad inicial para ambos tipos de inóculo debido a la multiplicación del mismo, al ser una temperatura próxima a la óptima para el crecimiento de este aislado (Morales-Rodríguez, 2011). A esta temperatura para ambos tipos de inóculo (triturado miceliar y clamidosporas) de *P. nicotianae* la densidad fue mínima a las 0 horas y máxima a los 7 días. Sin embargo, a 30 °C la supervivencia del inóculo-triturado miceliar e inóculo-clamidosporas fue mínima a las 0 h y 14 días, respectivamente. En este punto cabe señalar que a 30 °C la supervivencia del inóculo en los testigos fue significativamente menor que a 25 °C, por tanto, sin la presencia de materiales biofumigantes la temperatura influye de forma decisiva en la viabilidad del inóculo de *P. nicotianae*. Por el contrario, el inóculo de los testigos de *F. oxysporum* no mostró diferencias de supervivencia entre las dos temperaturas ensayadas pero si entre los tiempos de exposición. Los valores menores de densidad del inóculo de *F. oxysporum* se alcanzaron a los 14 días.

En relación al inóculo-talco de *F. oxysporum* cabe subrayar que en la supervivencia del mismo, además de influir el tiempo de exposición y la temperatura, es determinante el proceso de mezclar la tierra con el inóculo-talco. La densidad del inóculo de *F. oxysporum* en el tiempo 0 h fue aproximadamente 7 veces inferior a la densidad teórica introducida. La disminución de la concentración del patógeno al incorporar el inóculo-talco de *F. oxysporum* a la tierra ha sido observada por varios autores. Alabouvette (1983) y Alabouvette *et al.* (1984) inocularon el suelo con *F. oxysporum* f. sp. *melonis* en forma de inóculo-talco, detectando una concentración del patógeno en el suelo aproximadamente diez veces menor que aquella a la que se introdujo. Tello-Marquina y Alabouvette (1984) señalan que la disminución de la densidad de población cuando el inóculo-talco se introduce en un suelo natural está relacionada con la lisis de los propágulos más frágiles.

Los pellets produjeron la inactivación del inóculo de las especies de hongo estudiadas pero el porcentaje de inactivación fue diferente según la especie fúngica y tipo de inóculo para *P. nicotianae*, temperatura y tiempo de exposición. A las temperaturas ensayadas, 25 y 30 °C, los pellets produjeron inactivación del inóculo *F. oxysporum* (inóculo-talco) y de *P. nicotianae* (triturado miceliar y clamidosporas) por la liberación de compuestos volátiles tóxicos para los propágulos fúngicos.

Con respecto a *F. oxysporum*, la inactivación del inóculo mostró diferencias significativas entre temperaturas y tiempos de exposición. La inactivación fue significativamente mayor a 25 °C que a 30 °C. En principio, la inactivación debería ser mayor a 30 °C ya que la cantidad de compuestos volátiles es mayor. De acuerdo a Price *et al.* (2005) el incremento de la temperatura favorece la volatilización de los ITCs. Estos autores señalaron que la concentración de ITCs procedentes de la hidrólisis de los GSLs estaba correlacionada positivamente con la temperatura. No obstante, en el estudio de Morales-Rodríguez *et al.* (2018) los resultados de la DL<sub>50</sub> (Dosis Letal 50) presentaron una mayor eficacia a 10 °C que a 20 °C en la inhibición de la germinación de las conidias de *F. circinatum* por el efecto de los pellets de *B. carinata*.

El tiempo de exposición del inóculo-talco de *F. oxysporum* a los compuestos liberados por los pellets también influyó en la inactivación del inóculo. La máxima inactivación se produjo a las 48 horas y disminuyó conforme aumentó el tiempo de exposición a los compuestos volátiles. El descenso de la inactivación podría deberse a la reducción de la concentración de compuestos volátiles a lo largo del tiempo. Price *et al.* (2005) observaron que a 30 y 45 °C la concentración de alil-ITC incrementó de 0,25 h a 4 h y disminuyó de 4 h a 24 h.

En relación al efecto de los pellets en *P. nicotianae* se observaron diferencias de inactivación en función de la temperatura, tipo de inóculo y tiempo de exposición. En general, la inactivación fue mayor a 30 °C que a 25 °C para los dos tipos de inóculos de *P. nicotianae*.

A 25 °C, los pellets produjeron inactivación de los dos tipos de inóculo de *P. nicotianae*. La inactivación del inóculo-clamidosporas fue significativamente mayor que la del inóculo-triturado para todos los tiempos de exposición estudiados salvo a 24 horas, que no hubo diferencias entre los dos tipos de inóculo. Estas diferencias de inactivación pueden atribuirse a la naturaleza de los tipos de inóculo. En el triturado de micelio de *P. nicotianae* se pueden encontrar estructuras vegetativas (fragmentos de micelio y clamidosporas) y reproductivas (esporangios y zoosporas). En este ensayo las clamidosporas, a pesar de ser estructuras de resistencia, se mostraron más susceptibles que el inóculo-triturado miceliar a los compuestos liberados por los pellets. Morales-Rodríguez *et al.* (2016) señalaron que las estructuras vegetativas y reproductivas de *P. cinnamomi* respondieron de forma diferente al efecto biofumigante de los pellets de *B. carinata*.

Para la temperatura de 25 °C, la inactivación del inóculo-triturado miceliar fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo en el que el inóculo estuvo expuesto al material biofumigante, siendo máxima la inactivación a 24 horas y mínima o inexistente a los 14 días. La sinigrina (alil-GSL o 2-propenilo-GSL) es el GSL predominante en los pellets de *B. carinata*, los cuales, una vez humedecidos, liberan mayoritariamente alil-isotiocianato (AITC) que se libera pocas horas después de la hidratación de los pellets (De Nicola *et al.*, 2013; Lazzeri, 2014). Con respecto al inóculo-clamidosporas, la inactivación fue máxima a 48 horas y mínima a los 14 días. Morales-Rodríguez *et al.* (2016) observaron que la eficacia de los pellets para inhibir la germinación de clamidosporas y zoosporas de *P. cinnamomi* disminuía con el tiempo, la DL<sub>50</sub> a los 6 días era significativamente mayor que a los 3 días a 25 y 30 °C.

A la temperatura de 30 °C, la inactivación de *P. nicotianae* fue significativamente mayor para el inóculo-clamidosporas que para el inóculo-triturado miceliar a 24 h, 48 h y 7 días por el efecto de los pellets de *B. carinata*. Solamente la inactivación fue superior en el triturado miceliar respecto de las clamidosporas para el tiempo 14 días. En general, la inactivación fue mayor

conforme aumentó el tiempo de exposición a los compuestos liberados por los pellets para ambos tipos de inóculo de *P. nicotianae* a 30 °C, al contrario de lo observado para 25 °C.

En base a los resultados obtenidos en los diferentes ensayos es destacable la influencia de la temperatura en la eficacia de los materiales biofumigantes (especies de *Brassicaceae* en fresco, harina de semilla o pellets) para el control de *F. oxysporum* y *P. nicotianae*. La temperatura puede afectar al mismo tiempo al tipo y/o cantidad de compuestos volátiles liberados por los tejidos biofumigantes. Asimismo, puede influir en la inactivación de propágulos. La bisolarización puede ser una técnica prometedora para el control de hongos fitopatógenos, no obstante, dado el diferente comportamiento de las especies fúngicas sería necesario el diseño de estrategias específicas para cada especie de hongo.



# Capítulo 3



**Evaluación en condiciones de campo de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización para el control de *Phytophthora nicotianae***



### 3.1. Introducción

*Phytophthora nicotianae* es el principal agente causal de la tristeza de pimiento en Cáceres (Rodríguez-Molina *et al.*, 2010b). El cultivo de pimiento para pimentón es un cultivo de primavera-verano en esta región. Una opción ideal para el control de *P. nicotianae* sería cultivar especies de *Brassicaceae* durante el otoño-invierno y, en primavera, aplicar los tratamientos de solarización, biofumigación y biosolarización solos o en combinación con pellets (BioFence®) o harinas de semilla para el control del agente causal, aproximadamente un mes antes del trasplante de plantas de pimiento para pimentón.

Los cultivos de brásicas son muy interesantes en Extremadura por rotar con los cultivos de verano, aumentar el nivel de utilización de la tierra y ser compatibles con las condiciones edafoclimáticas. Para optimizar las técnicas de biofumigación y de biosolarización es necesario elegir especies de *Brassicaceae* con un elevado potencial biofumigante, es decir, con una alta producción de biomasa y una elevada concentración de GSLs en los tejidos, así como, poseer la capacidad de liberar la mayor cantidad de ITCs. Asimismo, el cultivo de determinadas especies de brásicas, como la coliflor o el brócoli, permitirían un doble aprovechamiento: la explotación comercial de las pellas y la incorporación al suelo de los restos vegetales como material biofumigante. Previamente, en el capítulo anterior se ha demostrado la eficacia de varios materiales biofumigantes en el control de *P. nicotianae*.

La biofumigación con material fresco de especies de *Brassicaceae* y los sistemas de rotación incrementan la materia orgánica del suelo, mejoran la estructura y controlan la erosión (Matthiessen y Shackleton, 2005). No obstante, esta práctica presenta varios aspectos negativos, como las costosas actividades agrícolas durante el cultivo, la pérdida de al menos un ciclo de producción con la consiguiente pérdida de ingresos (Lazzeri *et al.*, 2008), la variación en la producción de biomasa y la dependencia de los factores climáticos y edáficos (Rodríguez-Molina *et al.*, 2015).

La aplicación de harina de semilla de brásicas como material biofumigante permite la reutilización de residuos agroindustriales y tiene varias ventajas con respecto a los abonos verdes, como la disponibilidad durante todo el año y su bajo contenido de humedad, lo que permite almacenarla con un perfil estable de GSL (Rodríguez-Molina *et al.*, 2015). Además, es posible alcanzar un control más riguroso sobre las dosis de aplicación, así como una distribución más uniforme en el perfil del suelo (Mazzola y Zhao, 2010). El uso de biofumigantes en pellets (BioFence®) supera varias de las limitaciones de la biofumigación con materiales vegetales frescos, como tener que romper los tejidos antes de incorporarlos al suelo para que tenga lugar la hidrólisis y posterior liberación de ITCs, además, permite aprovechar concentraciones de GLSs imposibles de alcanzar mediante la aplicación de abonos verdes (Lazzeri *et al.*, 2008).

La adición de enmiendas orgánicas mejora las propiedades físico-químicas y la fertilidad del suelo, influye en las comunidades microbiológicas y disminuye indirectamente las enfermedades fúngicas mediante la alteración de la microbiota del suelo, además, promueve el desarrollo de microorganismos supresores (Zaccardelli *et al.*, 2013).

### **3.2. Objetivo**

El objetivo general de este capítulo fue evaluar, en condiciones de campo en primavera, el efecto de distintos tratamientos de solarización, biofumigación, y biosolarización usando diferentes especies de *Brassicaceae* (en forma de abono verde, harina de semilla o pellets), en la supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae*. Además, estudiar el efecto de estos tratamientos en las propiedades físico-químicas del suelo, en la producción de pimiento para pimentón y en la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota fúngica del suelo.

### 3.3. Finca experimental

El ensayo de campo se realizó en una de las parcelas (X: 702328; Y: 4303769) de la finca experimental Finca La Orden (38° 51' 36000" N, 06° 39' 55000" W), perteneciente al Instituto de Investigaciones Científicas Finca La Orden-Valdesequera, que forma parte del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX).

La Finca La Orden está situada en el término de Lobón, en las Vegas Bajas del Guadiana (Badajoz), con una superficie de 205 ha (95 ha de regadío y 110 ha de secano) dedicadas fundamentalmente a ensayos con diferentes cultivos agrícolas.

La principal causa de degradación de los suelos de la Finca La Orden y de las Vegas del Guadiana, con pendientes inferiores al 1 %, es el bajo contenido en materia orgánica que provoca una inestabilidad estructural que se ve reflejada por un encostramiento del suelo, aumento de la compactación y reducción de la permeabilidad, lo que conlleva a frecuentes encharcamientos del terreno.

El ensayo de campo se estableció en un suelo de tipo Alfisol Typic Haploxeralf, según la taxonomía de USDA-Soil Taxonomy (Jiménez *et al.*, 1976). Este suelo presenta una textura franco-arenosa, con las siguientes proporciones: 59,8 % de arena, 13,5 % de arcilla y 26,7 % de limo. Algunos parámetros químicos fueron determinados al inicio del establecimiento del ensayo, presentando los siguientes valores medios: 0,51 % de materia orgánica oxidable, 45 ppm de fósforo asimilable y 0,11 meq/100 g de potasio.

El clima de las Vegas del Guadiana es mediterráneo semi-árido. Los valores medios de las variables meteorológicas durante los años en los que se realizaron los experimentos (2008-2012) fueron los siguientes: a) Tª media anual: 16,13 °C; b) precipitación media anual: 498 mm; c) humedad media relativa: 88,56 % (<http://www.redarexplus.gobex.es>).

### 3.4. Material y métodos

#### 3.4.1. Diseño experimental

En el ensayo de campo se planteó un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones, y parcelas elementales de 5 x 5 m, separadas por pasillos de 3 m (Figura 3.1.). Los tratamientos de solarización, biofumigación y biosolarización se realizaron en la misma parcela de la Finca La Orden durante cuatro años consecutivos, desde 2008 a 2012, siguiendo, de forma general, las operaciones que se describen a continuación.



**Figura 3.1.** Diseño experimental del ensayo de campo. Imagen de las parcelas elementales de 5 x 5 m, separadas por pasillos de 3 m en la Finca La Orden (Esta tesis).

Previo a la implantación del ensayo, en las dos primeras campañas, se realizó un aporte de compost a razón de  $20 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$  que se incorporó al terreno con un pase de rotovator en los primeros 20-25 cm del suelo. En la Tabla 3.1 se recoge el análisis químico de la enmienda orgánica (compost) utilizada en cada una de las campañas. Cada campaña, para evitar la presencia de malas hierbas, competidoras de estas especies biofumigantes, se aplicó un tratamiento herbicida con Trifluralina a una dosis de  $1,5 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$ . Posteriormente, se marcaron las parcelas y se abonaron las parcelas con 8- 15 -15 (N-P-K) a razón de  $600 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ , no aplicándose abono en las parcelas testigo. Se sembraron las especies biofumigantes que fueron diferentes para cada campaña y al final del cultivo, en el mes de marzo, fueron incorporadas al suelo, marcando el inicio de los

tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización para evaluar la infectividad y supervivencia del inóculo de *Phytophthora nicotianae*. Previamente a la incorporación de las especies al suelo, se midió la producción de biomasa de las especies. Para realizar la medida de producción se utilizó un marco de 0,50 x 0,50 m, y se calculó la materia verde y seca producida e incorporada al suelo para cada una de las especies. Las especies biofumigantes se incorporaron al suelo mediante una labor de rotovator (Figura 3.2) a una profundidad de 20-30 cm.

**Tabla 3.1.** Análisis químico de la enmienda orgánica (compost) aplicada al suelo previo al establecimiento del ensayo de campo en las Campañas 2008-2009 y 2009-2010.

Parámetro	Campaña 2008-2009	Campaña 2009-2010
Materia orgánica total	16,34 %	14,00 %
Relación C/N	6,634	8,336
Nitrógeno total	1,20 %	0,79 %
Nitrógeno orgánico	1,10 %	0,75 %
Potasio soluble en agua	1,78 % K <sub>2</sub> O	0,56 % K <sub>2</sub> O
Fósforo sol. citrato amónico neutro	0,8 % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,75 % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Calcio total	1,46 % CaO	1,70 % CaO
Magnesio total	0,52 % MgO	0,65 % MgO
Sodio total	3085 ppm	1309 ppm
Azufre total	0,5 % SO <sub>3</sub>	—
Cobre total	11 ppm	17 ppm
Hierro total	7532 ppm	6027 ppm
Manganeso total	240 ppm	213 ppm
Zinc total	63 ppm	82 ppm
Extracto húmico total	4,72 %	4,12 %
Ácidos húmicos	3,20 %	2,60 %
Fósforo soluble en ácidos minerales	0,93 % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,99 % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Humedad	32,20 %	45,10 %





**Figura 3.2.** Incorporación de especies biofumigantes al suelo mediante labor de rotovator en el mes de marzo (Esta tesis).

En cada parcela elemental se introdujeron bolsas de tierra infectada con clamidosporas de *P. nicotianae* (sondas biológicas) a 15 cm y 30 cm de profundidad, se establecieron tres repeticiones por parcela. Además, se registró la temperatura y la humedad del suelo a estas dos profundidades para cada uno de los tratamientos aplicados. Tras el enterrado de sondas, tanto biológicas como de temperatura y humedad, se regaron las parcelas mediante aspersión durante 2 horas para favorecer el sellado del suelo e impedir el escape de los ITCs. Posteriormente, se colocaron los plásticos (polietileno transparente de 0,05 mm de grosor) en aquellas parcelas cuyos tratamientos lo requerían.

Una vez finalizados los diferentes tratamientos a finales del mes de abril, se procedió a levantar los plásticos (Figura 3.3) y retirar las sondas de temperatura, humedad y biológicas, estas últimas para su análisis en el laboratorio.





**Figura 3.3.** Levantamiento de plásticos de las parcelas tratadas al finalizar el periodo de desinfección (Esta tesis).

Varios días después del levantamiento de plásticos, en cada una de las parcelas del ensayo se recogieron muestras compuestas de tierra para su análisis químico. Posteriormente, se realizaron labores con chisel, rotovator y conformador para preparar el terreno, previo a la instalación del cultivo de pimiento para pimentón. Después de estas labores, se reconstruyeron las parcelas elementales, se abonaron con 9 -18 -27 (N-P-K) a razón de 400 kg ha<sup>-1</sup> y se instaló el riego por goteo. Una vez comprobado el funcionamiento del sistema de riego, se trasplantaron las plantas de pimiento para pimentón *C. annuum* var. Jaranda usando un marco de 0,70 x 0,30 m. Durante el desarrollo del cultivo de pimiento (Figura 3.4), se aplicó el abonado de cobertura mediante fertirrigación. La cantidad de abono líquido, dosificado en cuatro veces, fue de 48 l N20, 54 l P15 y 72 l K15.

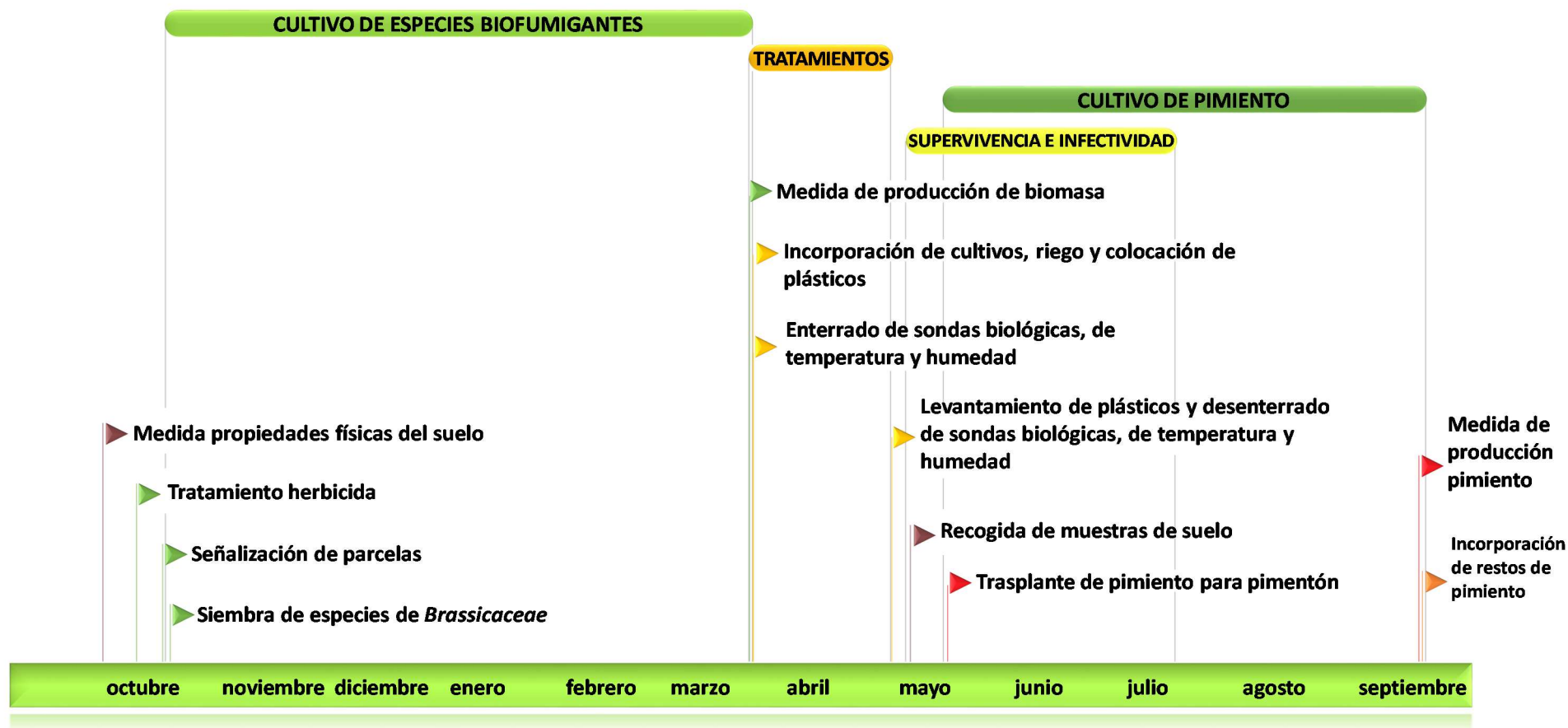


**Figura 3.4.** Cultivo de pimiento para pimentón en parcelas previamente tratadas mediante biofumigación, biosolarización y solarización en la Finca La Orden (Esta tesis).

A primeros de septiembre, se hicieron las medidas de producción de pimiento total, verde y rojo por parcela, estimándose la producción media  $\pm$  desviación estándar para ver si había diferencias significativas entre los tratamientos. Una vez realizadas todas las medidas, se segaron las plantas de pimiento con una picadora-segadora de forraje, y se incorporaron los residuos vegetales al suelo mediante pase cruzado de gradas.

Para evaluar los parámetros físico-químicos del suelo se tomaron muestras compuestas de suelo al inicio del establecimiento del ensayo (octubre de 2008) y después de finalizar los tratamientos en cada una de las campañas, en el mes de mayo. Además, al inicio de cada una de las campañas se hicieron medidas *in situ* de la resistencia a la penetrabilidad y densidad aparente por triplicado.

En la Figura 3.5 se representa un cronograma general de las principales actividades realizadas en cada una de las campañas del estudio.



**Figura 3.5.** Cronograma general de las actividades desarrolladas en cada una de las campañas del ensayo de campo.

### **3.4.2. Supervivencia e infectividad de *Phytophthora nicotianae***

#### **3.4.2.1. Producción de inóculo**

El inóculo utilizado en los ensayos de campo se obtuvo a partir de un aislado de *Phytophthora nicotianae* (P13) procedente de una planta de pimiento para pimentón afectada de tristeza.

Para la producción del inóculo, que consistió en una solución de clamidosporas, se siguió la metodología basada en la descrita por Tsao (1971) y por Mitchell y Kannwischer-Mitchell (1992) ya descrita en el capítulo anterior, en el punto 2.4.1.1.1.

Las bolsas de tierra o sondas biológicas fueron preparadas con tela de aguil que contenían 100 g de tierra desinfectada (autoclavada durante una hora a 121 °C tres días consecutivos) e inoculada con 2.500 clamidosporas de *P. nicotianae*.

Estas bolsas de inóculo fueron enterradas a dos profundidades (15 y 30 cm) en las parcelas donde se aplicaron los diferentes tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. Al final de los tratamientos, las sondas fueron desenterradas y fueron analizadas para determinar la supervivencia y la infectividad del inóculo.

#### **3.4.2.2. Supervivencia e infectividad del inóculo**

Para determinar la **supervivencia del inóculo** se emplearon pétalos inmaduros de clavel como trampas vegetales, según la metodología descrita por Ponchet *et al.* (1972). Se cogieron aproximadamente 15 gramos del suelo contenido en las sondas biológicas, se dispusieron en placas de Petri de 90 mm de diámetro, se añadió agua destilada hasta formar una lámina, flotando sobre ésta se colocaron los pétalos inmaduros de clavel (8-10 pétalos por placa de Petri). Las placas se incubaron en oscuridad a 22 °C durante un tiempo variable entre 2 y 15 días, y se examinaron diariamente los bordes de los pétalos al microscopio (100 x) para distinguir los esporangios típicos de *P. nicotianae*.

Los resultados de la variable dicotómica “supervivencia” fueron expresados como 1 (supervivencia) y 0 (no supervivencia) para cada una de las muestras analizadas para cada tratamiento y profundidad.

Para determinar la **infectividad del inóculo** en plantas de pimiento, se utilizó el resto del suelo contenido en cada una de las sondas biológicas. Este suelo fue introducido en un contenedor de plástico de 500 ml con una mezcla de vermiculita y turba (1:3) desinfectada en autoclave (1 h a 121 °C). Posteriormente, en estos contenedores se trasplantaron las plantas de pimiento var. Jaranda con el estado de 2-4 hojas verdaderas, procurando que las raíces estuvieran en contacto con la tierra sometida a los diferentes tratamientos.

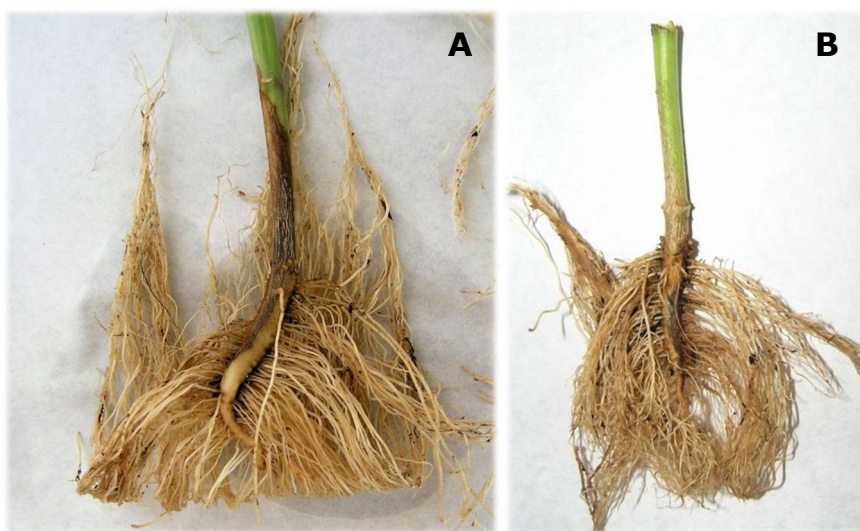
Los bioensayos se mantuvieron en invernadero climatizado bajo un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, con 28 °C durante el período de luz y 24 °C durante el de oscuridad (Figura 3.6). Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante dos meses y se evaluaron los síntomas de enfermedad semanalmente.



**Figura 3.6.** Invernadero climatizado con bioensayos de plantas de pimiento para evaluar la infectividad de *P. nicotianae* de las sondas biológicas enterradas en campo y expuestas a los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización (Esta tesis).



Cuando las plantas presentaron síntomas de enfermedad, las raíces de estas se lavaron con agua para observar los daños en el sistema radicular y cuello (Figura 3.7), y posteriormente se analizaron fragmentos de cuello y raíz en medio PDA y PARP (Jeffers y Martin, 1986) para confirmar la presencia de *P. nicotianae*. Al final del bioensayo, fueron examinados los sistemas radiculares de las plantas restantes para determinar la presencia de síntomas de enfermedad.



**Figura 3.7.** Plantas de pimienta con síntomas de tristeza. **A.** Chancros en el cuello, necrosis en raíz principal y raíces secundarias (Esta tesis). **B.** Pérdida del sistema radicular, necrosis en raíz principal y raíces secundarias (Esta tesis).

Los resultados de la variable dicotómica “infectividad” fueron expresados como 1 (infectividad) y 0 (no infectividad) para cada una de las muestras analizadas para cada tratamiento y profundidad.

### 3.4.3. Temperatura y humedad

La temperatura del suelo y humedad (contenido volumétrico de agua) fueron registradas mediante sondas durante el tiempo de aplicación de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. Estos parámetros se midieron a las profundidades de 15 y 30 cm para cada tratamiento evaluado. Las sondas de temperatura y humedad se conectaron a un datalogger Hobbo H8-4 32K (Onset Computer Corporation, Bourne, MA), los datos se registraron cada 30 minutos, siendo el valor registrado el valor promedio del periodo medido.

La temperatura se expresó en °C y la humedad del suelo o humedad volumétrica en  $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ .

#### 3.4.4. Análisis de los datos

Los datos de supervivencia e infectividad del inóculo se analizaron mediante regresión logística. Las variables explicadas o respuesta fueron la supervivencia e infectividad y las variables explicativas: profundidad y tratamiento. El objetivo de este análisis fue obtener un modelo o función para estimar la probabilidad de supervivencia o infectividad del inóculo en función de la profundidad y el tratamiento aplicado.

Asimismo, para estudiar la relación entre las variables supervivencia e infectividad se construyó de una tabla de contingencia y, a continuación, se realizó la prueba de  $\chi^2$  de Pearson para determinar la existencia o no de asociación entre ambas variables. En el caso de que si existiera relación entre las variables, el grado de relación se calculó mediante el coeficiente de contingencia de Pearson (C), según la siguiente fórmula:

$$C = \sqrt{\frac{x^2}{n + x^2}}$$

Los valores de C están comprendidos entre 0 y  $C_{\text{máx.}} = \sqrt{\frac{k-1}{k}}$

Los datos medios de temperatura fueron analizados mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) a dos vías (tratamiento y profundidad). Las temperaturas medias fueron comparadas mediante el test de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher con un nivel del 95 % de confianza. Previo al análisis estadístico se comprobó que los datos cumplían los requisitos de homocedasticidad y normalidad.

Los análisis estadísticos mediante regresión logística y ANOVA se realizaron con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.II. (Statistical Graphics Corp.). La construcción de las tablas de contingencia y la estimación del coeficiente de

contingencia se realizaron con el programa estadístico R versión 3.5.1. (The R Foundation for Statistical Computing, 2018).

### 3.5. Campañas

#### A. Campaña 2008-2009

Se evaluaron cinco tratamientos, con y sin plástico: 1) *B. carinata* / *B. carinata* + Plástico; 2) *B. nigra* / *B. nigra* + Plástico; 3) *B. oleracea* var. *botrytis* / *B. oleracea* var. *botrytis* + Plástico; 4) *S. alba* / *S. alba* + Plástico; 5) Testigo / Testigo + Plástico.

El día 17 de octubre de 2008 se sembraron las especies de *Brassicaceae*: *B. carinata*, *B. nigra* y *S. alba* a una dosis de siembra de 10 kg·ha<sup>-1</sup>. Las plantas de *B. oleracea* var. *botrytis* se trasplantaron en las parcelas elementales usando un marco de 0,30 m x 0,75 m. El cultivo se prolongó hasta el mes de marzo, en el cual se hicieron las medidas de producción de biomasa de las especies, previo a la incorporación de estas al suelo mediante pase de rotovator.

En el caso de *B. oleracea* var. *botrytis* (coliflor) el manejo del cultivo fue diferente, con el objetivo de buscar una explotación comercial y un aprovechamiento de la especie como biofumigante. El 6 y 13 de marzo de 2009 se recogieron las coliflores comerciales, eliminando parte de la producción del cultivo. Antes de la incorporación de este cultivo al suelo, se estimó la producción media de esta especie, para ello se cogió una de las filas centrales representativa de la parcela, se cortaron los pies de la fila y se pesaron, este número se multiplicó por 6 filas que tenía la parcela, y los datos se expresaron en kg m<sup>-2</sup>.

La incorporación al suelo de las distintas especies biofumigantes y sondas (biológicas y de temperatura) asociadas a estos tratamientos se realizaron en diferentes fechas. El estado fenológico de las especies biofumigantes marcó las diferentes fechas de incorporación, intentando conseguir una mayor producción



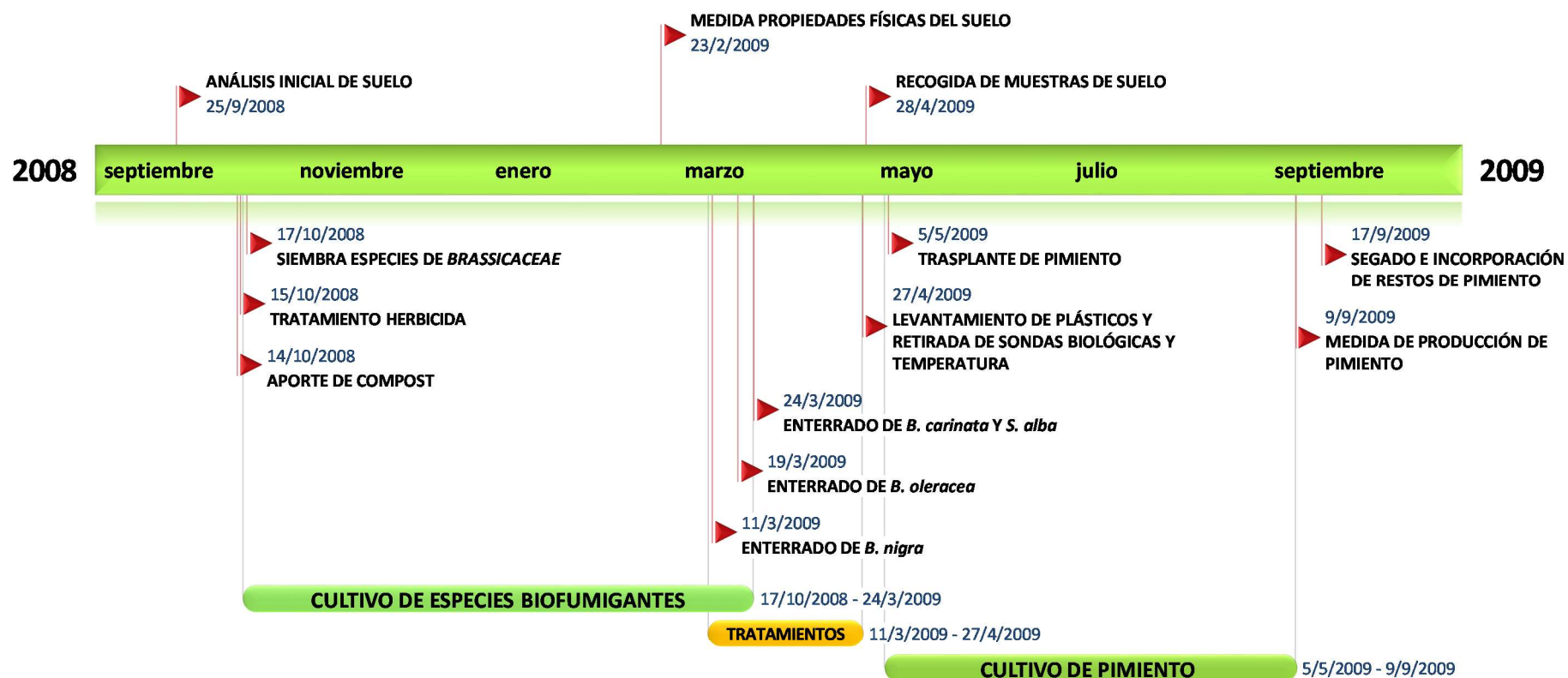
de glucosinolatos y de biomasa para obtener una mayor inactivación del inóculo de *P. nicotianae*. El 11 de marzo de 2009 se incorporaron las parcelas de *B. nigra*, con un estado fenológico 4.2 (semillas en las silicuas inferiores de color verde oscuro) de acuerdo a las claves de Berkenkamp (1973). La producción media  $\pm$  desviación estándar ( $n=8$ ) de materia verde y seca fueron  $3,74 \pm 0,44 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  y  $0,73 \pm 0,09 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ , respectivamente. El día 19 de marzo se incorporó *B. oleracea*, con producciones de materia verde y seca de  $1,78 \pm 0,46 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  y  $0,25 \pm 0,07 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ , respectivamente. Las especies *B. carinata* y *S. alba* fueron incorporadas el 27 de marzo, con producciones medias de materia verde/seca igual a  $5,06 \pm 0,51/0,89 \pm 0,09 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  y  $4,42 \pm 1,12/0,85 \pm 0,22 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ . Los estados fenológicos de las especies en el momento de la incorporación al suelo fueron los siguientes: 1) *B. oleracea*: explotación comercial; 2) *B. carinata*: 3.2 (todas las yemas florales abiertas e incremento del tamaño de semillas); 3) *S. alba*: 4.2 (semillas en las silículas inferiores de color verde oscuro). Las sondas biológicas del tratamiento Testigo se enterraron de forma escalonada, siguiendo las fechas en las que se enterraron las distintas especies. Después de la incorporación de las especies al suelo se regaron las parcelas mediante aspersión y, a continuación, se colocaron los plásticos en aquellas parcelas cuyos tratamientos lo requerían.

El día 27 de abril de 2009 se levantaron los plásticos y se recogieron las sondas de temperatura y sondas biológicas, dando fin a los diferentes tratamientos. Al día siguiente, se cogieron muestras de suelo de cada una de las parcelas para su análisis.

El 5 de mayo se hizo el trasplante de pimiento para pimentón, finalizando el cultivo el 9 de septiembre, fecha en la que se hicieron las medidas de producción. Posteriormente, se segaron las plantas de pimiento y se incorporaron los restos mediante gradeo.

Las medidas de resistencia a la penetrabilidad y densidad aparente no se pudieron realizar al inicio del establecimiento del ensayo (octubre de 2008) debido a las continuas lluvias, por lo que se tuvieron que realizar “excepcionalmente” en el mes de febrero en los tratamientos testigo. Estas mediciones se repitieron en octubre de 2009, antes de establecer el nuevo ensayo de campo.

El cronograma de las principales actividades desarrolladas en la Campaña 2008-2009 se recoge en la Figura 3.8.



**Figura 3.8.** Cronograma general de las actividades desarrolladas en la Campaña 2008-2009.

## A.1. Resultados

### I. Supervivencia e infectividad

La *supervivencia* de *P. nicotianae* fue muy elevada, en el 97,06 % de las muestras analizadas el inóculo sobrevivió. Del análisis mediante regresión logística se obtuvo el siguiente modelo que permite calcular la probabilidad de supervivencia del inóculo.

$$\text{Supervivencia} = \frac{e^{3,5}}{1 + e^{3,5}}$$

Este modelo reduce significativamente la desviación ( $P < 0,05$ ) y el p-valor de los residuos ( $P > 0,05$ ) indica que no existe una pérdida de ajuste significativa, por tanto, el modelo es útil para predecir la probabilidad de supervivencia del inóculo. Ninguna de las variables estudiadas (profundidad y tratamiento) fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) para explicar la supervivencia del inóculo, es decir, ni la profundidad ni los tratamientos aplicados influyeron en la supervivencia del inóculo.

En relación a la variable *infectividad*, el 37,92 % de las muestras analizadas provocaron enfermedad en las plantas del bioensayo. El modelo obtenido por regresión logística fue igual a:

$$\text{Infectividad} = \frac{e^{-0,39 - 1,22Z_{B.o.}}}{1 + e^{-0,39 - 1,22Z_{B.o.}}}$$

Este modelo redujo significativamente la desviación ( $P < 0,05$ ) y permite predecir la probabilidad de infectividad del inóculo de *P. nicotianae*. De las variables explicativas, solo el tratamiento de biofumigación con *B. oleracea* influyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en la reducción de la infectividad. Este tratamiento redujo 1,22 veces la probabilidad de que el inóculo produzca enfermedad en la planta de pimiento. Por el contrario, ni la profundidad ni el resto de tratamientos influyeron en la variable respuesta estudiada, la infectividad del inóculo.

La tabla de contingencia (Tabla 3.2) permite estudiar la relación entre las variables supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae*. En esta tabla se presentan las frecuencias observadas para cada una de las diferentes categorías (0 y 1) de las variables.

**Tabla 3.2.** Tabla de contingencia para estudiar la relación entre la supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* durante la campaña 2008-2009.

Infectividad	Supervivencia	
	0	1
0	2	145
1	5	86

Para conocer si existía relación entre las variables estudiadas se realizó un contraste de hipótesis mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson. Según los resultados de este contraste, las variables supervivencia y la infectividad no están relacionadas significativamente a un nivel de significación del 0,05.

## II. Temperatura

Las temperaturas registradas durante la desinfección del suelo se comportaron de forma similar a ambas profundidades para todos los tratamientos, aunque las fluctuaciones diarias fueron mayores a 15 cm que a 30 cm.

Las temperaturas medias fueron bajas, inferiores a 25 °C en todos los tratamientos, y las temperaturas máximas oscilaron entre 36,2 °C (*B. oleracea* + P, 15 cm) y 20,0 °C (*B. nigra*, 30 cm).

El análisis de la varianza a dos vías (tratamiento y profundidad) presentó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de temperatura media para los factores tratamiento ( $F=165,12$ ) y profundidad ( $F=9,05$ ), la interacción tratamiento x profundidad fue significativa ( $F=3,18$ ).

Se realizaron ANOVAs con un factor fijo (tratamiento) y los resultados indicaron que las temperaturas medias no difirieron significativamente entre profundidades, excepto para los tratamientos *B. oleracea* + P y Testigo + P. Estos

tratamientos presentaron una mayor temperatura a 15 cm que a 30 cm, siendo las diferencias de temperatura entre ambas profundidades igual a 2,1 °C para *B. oleracea* + P y 1,4 °C para el tratamiento Testigo + P.

Los ANOVAs con un factor fijo (profundidad) mostraron que para las dos profundidades había diferencias significativas de temperatura entre los tratamientos. Para cada profundidad se diferenciaron varios grupos homogéneos entre los tratamientos de acuerdo al test de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Temperatura media del suelo  $\pm$  desviación estándar a 15 y 30 cm de profundidad en los tratamientos ensayados en la primavera de 2009.

Tratamiento	Temperatura (° C)	
	15 cm	30 cm
<i>B. carinata</i>	16,0 $\pm$ 1,9 a	15,8 $\pm$ 1,5 a
<i>B. carinata</i> + P	21,6 $\pm$ 2,2 b	20,8 $\pm$ 2,0 c
<i>B. oleracea</i>	16,4 $\pm$ 1,9 a	16,1 $\pm$ 1,4 ab
<i>B. oleracea</i> + P	23,5 $\pm$ 2,5 c	21,4 $\pm$ 2,4 cd
<i>B. nigra</i>	16,0 $\pm$ 1,5 a	15,8 $\pm$ 1,4 a
<i>B. nigra</i> + P	21,7 $\pm$ 2,1 b	22,2 $\pm$ 2,8 d
<i>S. alba</i>	16,0 $\pm$ 1,6 a	16,8 $\pm$ 1,8 b
<i>S. alba</i> + P	21,2 $\pm$ 3,0 b	20,7 $\pm$ 2,8 c
Testigo	16,2 $\pm$ 1,8 a	16,0 $\pm$ 1,4 ab
Testigo + P	22,8 $\pm$ 2,3 c	21,4 $\pm$ 2,2 cd

Para cada profundidad los tratamientos seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) según el test de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher.

La temperatura de los tratamientos con plástico difirió significativamente de la de los tratamientos sin plástico a las dos profundidades. La diferencia de temperatura a 15 y 30 cm por el efecto del plástico fue de 6,1 °C y 5,4 °C, respectivamente.

Solamente el 7,5 % del tiempo de aplicación de los tratamientos la temperatura fue superior a 25 °C. El tratamiento *B. oleracea* + P presentó el mayor número de horas acumuladas en el intervalo de temperatura 25 -35 °C, y además, fue el único tratamiento que superó los 35 °C (10 horas).

## A.2. Discusión

En esta primera campaña la supervivencia del inóculo de *P. nicotianae* fue muy elevada y no se vio afectada ni por los tratamientos aplicados ni por la profundidad a la que fue enterrado el inóculo. Por el contrario, la infectividad del inóculo (38 %) fue relativamente baja en relación a la supervivencia del mismo (97 %), no observándose relación entre ambas variables. No solo la infectividad fue inferior a la supervivencia sino también esta variable fue influenciada por el tratamiento *B. oleracea*, que redujo la incidencia de la enfermedad.

Las temperaturas medias registradas durante el periodo de aplicación de los tratamientos fueron bajas, inferiores a 25 °C, y pudieron favorecer la germinación de las clamidosporas y facilitar la multiplicación del inóculo ya que estas temperaturas son próximas a la temperatura óptima de crecimiento (26 °C) de *P. nicotianae* (Morales-Rodríguez, 2011). Picón-Toro (2011) observó la multiplicación del inóculo de *P. nicotianae* a temperaturas constantes, 20 y 25 °C, siendo la multiplicación mayor a 25 °C. Coelho *et al.* (2000) señalaron que las clamidosporas de *P. nicotianae* pueden sobrevivir a exposiciones de 35 °C durante 480 h. Las temperaturas registradas están muy alejadas de las reportadas por otros autores para los tratamientos de biosolarización y solarización. Lombardo *et al.* (2012) indicaron que durante la solarización se alcanzaron temperaturas medias de 43,1 °C y 43,2 °C y temperaturas máximas de 46,2 °C y 48 °C. En el año 2010, los ensayos realizados en invernaderos de Murcia por Lacasa *et al.* (2015) registraron temperaturas por encima de 35 °C entre 723 y 930 horas en tratamientos de biosolarización con crucíferas, mientras que en este ensayo solo se superaron los 35 °C durante 10 horas en uno de los tratamientos (*B. oleracea* + P).

Las especies biofumigantes, combinadas con o sin plástico, tampoco redujeron el inóculo de *P. nicotianae*. No obstante, Picón-Toro *et al.* (2012a) observaron en condiciones *in vitro* que diferentes especies de *Brassicaceae* inactivaron el inóculo a temperaturas de 20 y 25 °C. A pesar de que estas temperaturas son relativamente bajas, los tejidos vegetales liberaron

compuestos volátiles que fueron tóxicos para el inóculo de *P. nicotianae*. La inactivación fue diferente para las distintas especies empleadas, *Capsella bursa-pastoris* y *Brassica nigra* inactivaron el 100 % del inóculo a 25 °C. A pesar de que estas temperaturas son relativamente bajas, los tejidos vegetales liberaron compuestos volátiles que fueron tóxicos para el inóculo de *P. nicotianae*.

Las especies utilizadas en el ensayo de campo fueron elegidas por su potencial biofumigante, alto contenido de GSLs, elevada producción de biomasa y previamente habían sido ensayadas en condiciones *in vitro*. La biomasa incorporada para cada una de las especies fue variable, solo los tratamientos con las especies *B. carinata* y *S. alba* incorporaron cantidades similares a la recomendada (50 t·ha<sup>-1</sup>) por Bello *et al.* (2004). No obstante, ni la especie ni la cantidad de materia incorporada afectaron a la supervivencia del inóculo. Borek *et al.* (1995) indicaron que la eficiencia de conversión de GSLs a ITCs en el suelo podría ser tan baja como del 15 %. La hidrólisis de los GSLs y, por lo tanto, la formación de ITCs en el suelo es dependiente del nivel de maceración de los tejidos vegetales (Morales-Rodríguez *et al.*, 2014). Morra y Kirkegaard (2002) obtuvieron muy bajas concentraciones de ITCs en el suelo tras la incorporación de brásicas (*B. juncea* y *B. napus*), solamente detectaron el 1 % de la concentración de ITCs prevista a partir de tejidos con alta concentración de GSLs. Mattner *et al.* (2008) no encontraron niveles detectables de ITCs en el suelo tras la incorporación de cosechas biofumigantes mediante rotovator. Por otra parte, Doheny-Adams *et al.* (2018) resaltan que los resultados de laboratorio basados en la toxicidad de ITCs no son siempre traducidos en resultados de campo. Los ITCs generados varían en la vida media, reactividad, volatilidad y porcentaje de absorción por la materia orgánica, lo que provoca comportamientos complejos en el suelo. En consecuencia, las dosis efectivas son variables y dependen de factores ambientales (tipo y densidad del suelo, humedad y temperatura) y factores biológicos (especie vegetal, etapa de crecimiento, tipo de tejido y estación).



En relación a la infectividad, esta fue muy baja en comparación con la supervivencia del inóculo. Solamente el tratamiento *B. oleracea* redujo la infectividad, aproximadamente 1,22 veces. La baja incidencia de la enfermedad puede ser atribuida a varios factores: la incapacidad del patógeno para producir enfermedad, la baja concentración del inóculo y la “supresividad de enfermedad” del suelo (Weller *et al.*, 2002), esta puede ser natural o estar relacionada con los cambios microbiológicos experimentados en el suelo por la aplicación de diferentes tratamientos.

### **B. Campaña 2009-2010**

Inicialmente los tratamientos iban a ser iguales a los de la primera campaña, de hecho, el 26 de octubre de 2009 se sembraron las mismas especies a las mismas dosis de siembra que en el año 2008. Sin embargo, la germinación de las semillas y el desarrollo de los cultivos fueron muy irregulares debido a las condiciones meteorológicas, y finalmente, se descartó el aprovechamiento de los cultivos de *B. carinata* y *B. oleracea* var. *botrytis*. Los tratamientos ensayados fueron: 1) *B. nigra* / *B. nigra* + Plástico; 2) *S. alba* / *S. alba* + Plástico; 3) Testigo / Testigo + Plástico.

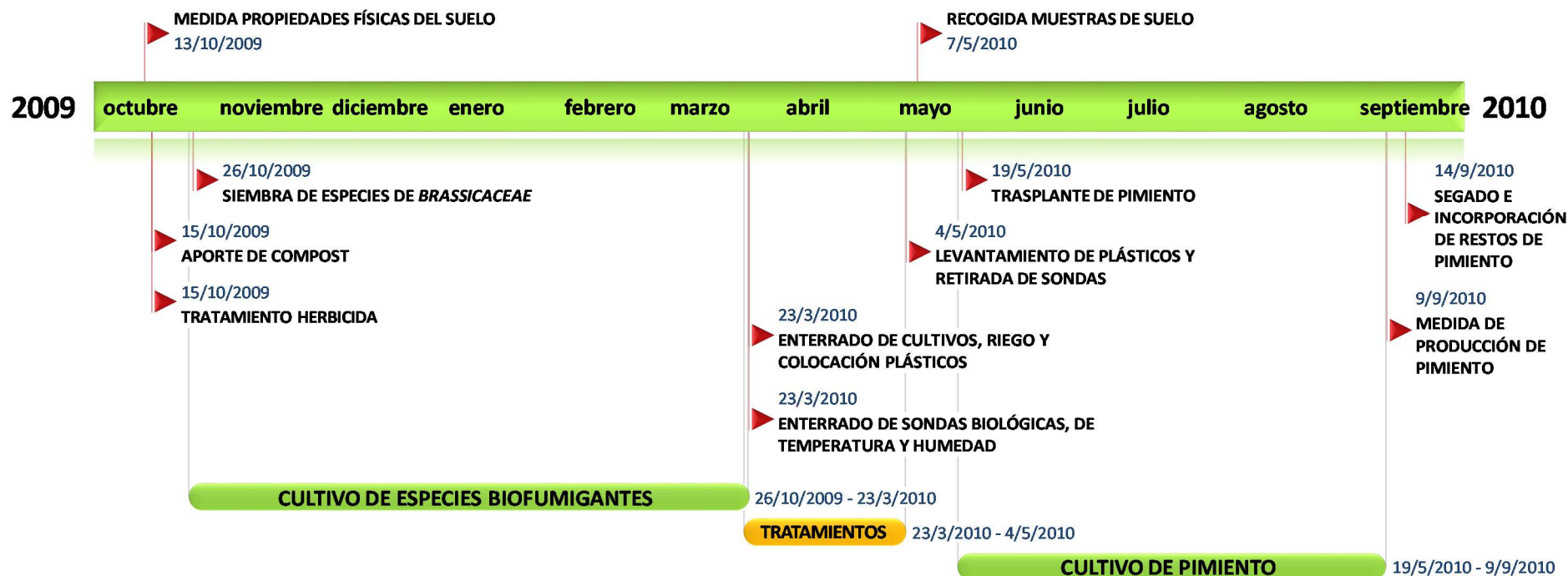
El 23 de marzo de 2010 se incorporaron las especies cultivadas al suelo y se enterraron las sondas biológicas, de temperatura y humedad. Previamente se había medido la producción media de materia verde/seca  $\pm$  desviación estándar ( $n=8$ ) de las especies: *B. nigra*:  $4,37 \pm 0,40$  /  $0,94 \pm 0,08$  kg·m<sup>-2</sup> y *S. alba*:  $1,78 \pm 0,70$  /  $0,45 \pm 0,16$  kg·m<sup>-2</sup>. Los estados fenológicos de las especies, de acuerdo a las claves de Berkenkamp, fueron los siguientes: 1) *B. nigra*: 4.2 (semillas en las silicuas inferiores de color verde oscuro); 2) *S. alba*: 3.2 (todas las yemas florales abiertas y aumento de tamaño de semillas).

La finalización del periodo de desinfección tuvo lugar el día 4 de mayo de 2010 con el levantamiento de plásticos y la retirada de sondas de temperatura, humedad y biológicas. Dos días después se recogieron las muestras de suelo de cada parcela para el análisis químico, con el objetivo de determinar las posibles

diferencias en los parámetros antes y después de aplicar los tratamientos. A mediados del mes de mayo se preparó el terreno mediante laboreo para el trasplante de pimiento que se realizó el 19 de mayo de 2010, finalizando el cultivo el 13 de septiembre de 2010 con la medida de producción de pimiento rojo y verde. Posteriormente, se segó el cultivo de pimiento e incorporó al suelo mediante pase cruzado de gradas.

A mediados del mes de octubre se realizaron las medidas de los parámetros físicos: densidad aparente y resistencia a la penetrabilidad.

En la Figura 3.9 se representa el cronograma de las principales actividades realizadas durante esta campaña.



**Figura 3.9.** Cronograma general de las actividades desarrolladas en la Campaña 2009-2010.

## B.1. Resultados

### I. Supervivencia e infectividad

En esta campaña la supervivencia no se analizó y la infectividad del inóculo de *P. nicotianae* se detectó en el 43 % de las plantas analizadas. La infectividad fue mayor que en la campaña anterior.

Del análisis mediante regresión logística se obtuvo el siguiente modelo que permite calcular la probabilidad de infectividad del inóculo.

$$\text{Infectividad} = \frac{e^{-0,223}}{1 + e^{-0,223}}$$

Este modelo redujo significativamente la desviación ( $P < 0,05$ ) y según este, ninguna de las variables estudiadas (profundidad y tratamiento) fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) para explicar la infectividad del inóculo.

### II. Temperatura

Al igual que en la campaña anterior, las temperaturas medias y máximas fueron superiores a 15 cm. Las temperaturas medias del suelo fueron inferiores a 25 °C en todos de los tratamientos aplicados en la primavera de 2010 (Tabla 3.4). Las temperaturas máximas alcanzadas variaron entre 34,81 °C (*B. nigra* + P, 15 cm) y 24,77 °C (*B. nigra*, 30 cm).

**Tabla 3.4.** Temperatura media del suelo  $\pm$  desviación estándar a 15 y 30 cm de profundidad en los tratamientos ensayados en la primavera de 2010.

Tratamiento	Temperatura (° C)	
	15 cm	30 cm
<i>B. nigra</i>	16,61 $\pm$ 3,68	16,39 $\pm$ 2,98
<i>B. nigra</i> + P	23,73 $\pm$ 4,70	20,86 $\pm$ 3,60
<i>S. alba</i>	17,22 $\pm$ 4,19	16,68 $\pm$ 3,14
<i>S. alba</i> + P	23,35 $\pm$ 4,27	21,76 $\pm$ 3,73
Testigo	16,65 $\pm$ 3,96	16,46 $\pm$ 3,14
Testigo + P	23,59 $\pm$ 4,71	21,39 $\pm$ 3,77

El análisis de la varianza a dos vías (tratamiento y profundidad) mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para el factor tratamiento ( $F = 68,41$ ) y profundidad ( $F = 15,64$ ) y la interacción de estos factores no fue significativa ( $F = 2,14$ ). El test de Fisher (LSD) diferenció dos grupos homogéneos entre los tratamientos para los dos factores estudiados. Para el factor tratamiento, los tratamientos con plástico presentaron una temperatura significativamente mayor ( $5,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) que los tratamientos sin plástico. En relación a la profundidad, la temperatura fue significativamente mayor a 15 cm que a 30 cm.

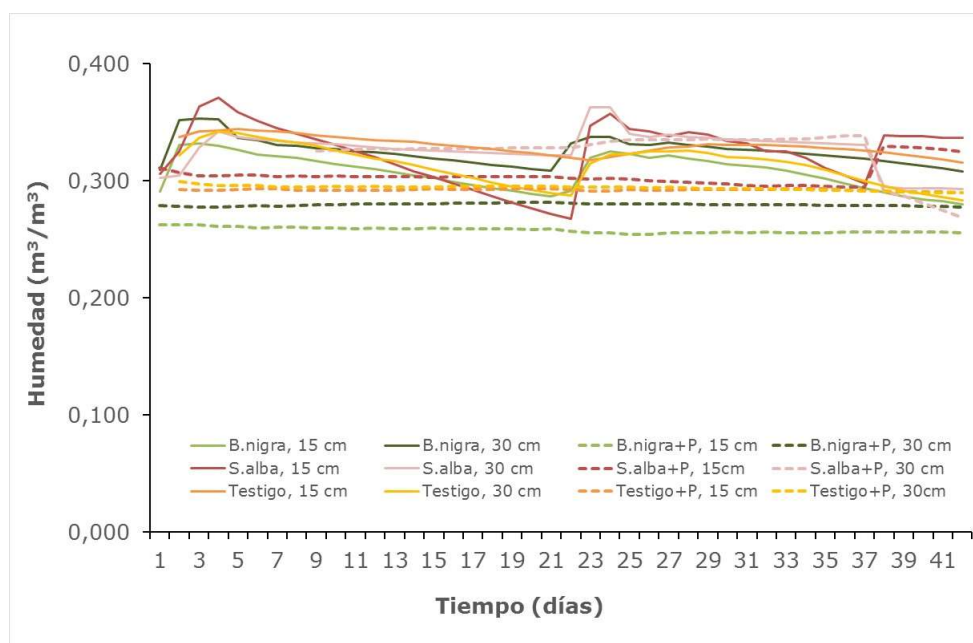
Aproximadamente, solo el 15 % del tiempo de aplicación de los tratamientos, las temperaturas fueron superiores a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los tratamientos con plástico presentaron mayor número de horas acumuladas en el intervalo  $25 - 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , siendo el tratamiento *B. nigra* + P el que presentó el mayor número de horas acumuladas en dicho intervalo.

### III. Humedad

En la Figura 3.10 se recoge la evolución de las humedades medias del suelo ( $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ), a 15 y 30 cm, de los tratamientos ensayados en la primavera de 2010.

Los valores medios de humedad estuvieron comprendidos entre 0,259 y  $0,334\text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ , equivalentes al 60,8 % y 78,2 % de saturación del suelo. El tratamiento *B. nigra* + P (15 cm) presentó el menor contenido de humedad. Los tratamientos con plástico apenas sufrieron variaciones (Figura 3.10), observándose una reducción media de la humedad del 3,50 %. De los tratamientos sin plástico, el tratamiento *S. alba* a 15 cm fue el que sufrió mayor descenso de humedad (38,84 %).

En general, todos los tratamientos presentaron mayor humedad a 30 cm que a 15 cm, a excepción del tratamiento Testigo, que presentó valores medios de  $0,330$  y  $0,314\text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$  a 15 y 30 cm, respectivamente.



**Figura 3.10.** Evolución de la humedad volumétrica ( $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ) en los tratamientos evaluados durante la aplicación de tratamientos en la primavera de 2010.

## B.2. Discusión

En la segunda campaña del estudio, el porcentaje global de plantas enfermas fue superior (43 %) al de la campaña anterior. Ninguna de las variables (tratamiento aplicado y profundidad) influyeron significativamente en la estimación de la probabilidad de la infectividad del inóculo de *P. nicotianae*. No obstante, los tratamientos con plástico y el tratamiento *S. alba* presentaron menor incidencia de la enfermedad. En los tratamientos con plástico, la diferencia de infectividad podría ser debida al efecto del plástico, que incrementó la temperatura aproximadamente 5,7 °C con respecto a los tratamientos sin plástico. Además, el plástico pudo contribuir a la retención de los gases liberados durante la descomposición de las especies biofumigantes y a mantener la humedad del suelo. La humedad del suelo favorece la hidrólisis de los GSLs, por tanto, influye en la liberación de ITCs (Morra y Kirkegaard, 2002). Los tratamientos con plástico apenas sufrieron cambios en el contenido de la humedad del suelo, y, en general, todos los tratamientos a 30 cm presentaron mayor humedad que a 15 cm. No obstante, estas diferencias de humedad entre las dos profundidades tampoco implicaron una infectividad significativamente diferente.

El tratamiento *S. alba* presentó el menor número de plantas enfermas en comparación con los tratamientos *B. nigra* y Testigo. Si se tiene en cuenta la temperatura media y máxima alcanzada en el tratamiento *S. alba* no fue de las mayores, además, destacó la escasa biomasa incorporada al suelo ( $1,78 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ) frente a la de *B. nigra* ( $4,37 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ). *S. alba* podría ser más efectiva que *B. nigra* para el control de *P. nicotianae* en condiciones de campo, no obstante, estos datos no concuerdan con los publicados por Picón-Toro (2011). Estos autores describieron mejores resultados para la especie *B. nigra* en la inactivación de clamidosporas de *P. nicotianae* cuando simulaban condiciones de biofumigación en primavera en Extremadura. En este sentido, Morales-Rodríguez (2011) indicó que *B. nigra* fue más eficaz que *S. alba* en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae*.

Las discrepancias de infectividad podrían ser atribuidas a la diferente capacidad de conversión de GSLs a ITCs y al estado fenológico en el momento de la incorporación de las especies *S. alba* y *B. nigra*, que fueron 3.2 y 4.2, respectivamente (Berkenkamp, 1973). El estado de máxima floración de *S. alba* (3.2) proporcionó mejores resultados que el estado 4.2 (semillas verdes en las silicuas inferiores) de *B. nigra*. Varios autores indicaron que los niveles de glucosinolatos y los compuestos relacionados varían durante el desarrollo de la planta y entre los tejidos de la planta (Smith y Griffiths, 1988; Clossais-Besnard y Larher, 1991; Rosa *et al.*, 1996).

### C. Campaña 2010-2011

En esta campaña se sembraron las especies *B. nigra* y *S. alba* a una dosis de siembra de  $10 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  y en el momento de la incorporación de estas al suelo, se añadió harina de semilla de colza *B. napus* var. *oleifera* (torta de colza) a dos dosis diferentes, a razón de  $7.000 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  (TC1) y  $14.000 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  (TC2). Los tratamientos ensayados fueron: 1) *B. nigra* + Plástico / *B. nigra* + TC1 + Plástico / *B. nigra* + TC2 + Plástico; 2) *S. alba* + Plástico / *S. alba* + TC1 + Plástico / *S. alba* + TC2 + Plástico; 3) Testigo / Testigo + Plástico / Testigo + TC1 + Plástico / Testigo + TC2 + Plástico.

El día 27 de septiembre de 2010 se sembraron las especies de *Brassicaceae* y a finales de marzo de 2011 se midió la producción de materia verde/seca  $\pm$  desviación estándar ( $n=12$ ) de los cultivos: *B. nigra*:  $2,21 \pm 0,54$  /  $0,59 \pm 0,14$   $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$  y *S. alba*:  $4,42 \pm 1,12$  /  $0,85 \pm 0,22$   $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ . Los estados fenológicos fueron los siguientes: 1) *B. nigra*: 4.5 (semillas en las silicuas superiores todas de color marrón); 2) *S. alba*: 4.0 (semillas traslúcidas en las silículas inferiores).

Las especies cultivadas se incorporaron el 30 de marzo de 2011 mediante pase de rotovator, y una vez incorporadas, se repartió la torta de colza a razón de  $7.000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  y  $14.000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  en las parcelas seleccionadas y se le dio un pase con rotovator para incorporar la torta de colza a una profundidad de 20-30 cm. A continuación, se enterraron las sondas biológicas, de temperatura y humedad. Las parcelas se regaron mediante aspersión durante dos horas y seguidamente se colocaron los plásticos (Figura 3.11).



**Figura 3.11.** Parcelas elementales cubiertas con plástico en el mes de marzo de 2011 (Esta tesis).

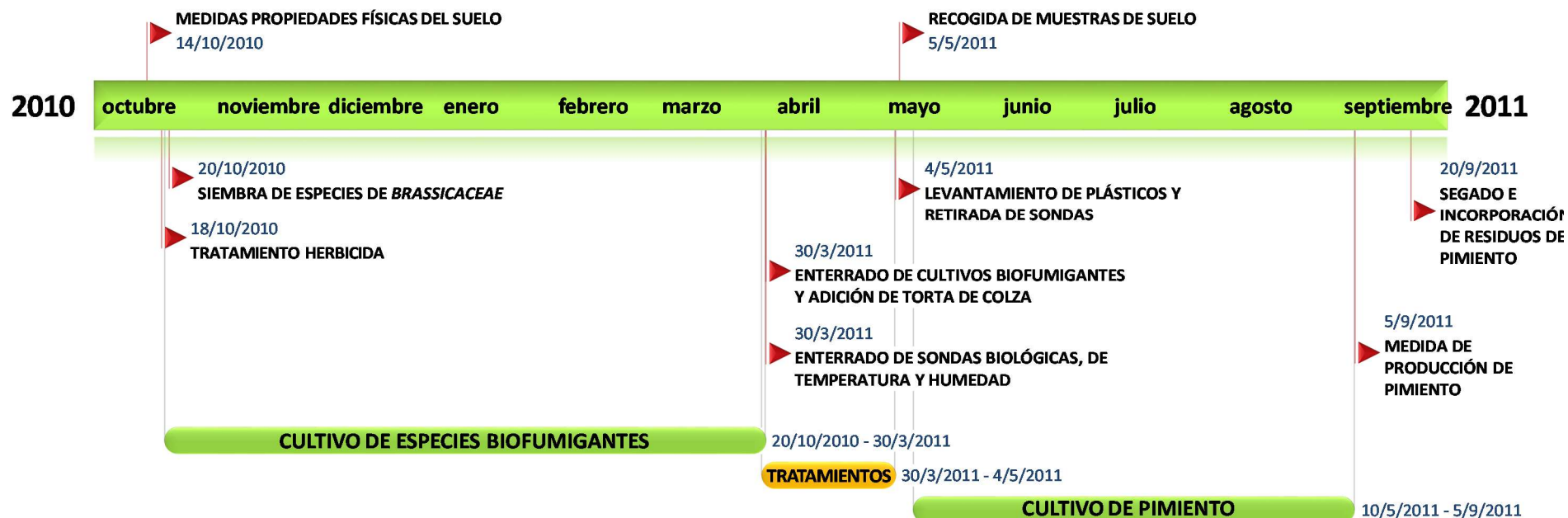
El día 4 de mayo de 2011 finalizaron los tratamientos, se levantaron los plásticos y se retiraron las bolsas de inóculo, las sondas de temperatura y humedad. Las muestras de suelo se recogieron el 5 de mayo para su posterior análisis en el laboratorio.



El cultivo de pimiento para pimentón se estableció el 10 de mayo de 2011 y finalizó el 5 de septiembre con la medida de la producción de pimiento rojo y seco, las plantas de pimiento fueron segadas e incorporadas al suelo varios días después.

En la primera semana de octubre se realizaron las medidas de densidad y resistencia a la penetrabilidad y en esta fecha, excepcionalmente, se recogieron muestras de suelo para el análisis químico con el objeto de comparar los parámetros antes y después del cultivo de pimiento.

En la Figura 3.12 se especifican las actividades realizadas durante esta campaña.



**Figura 3.12.** Cronograma de las actividades realizadas en la Campaña 2010-2011.

## C.1. Resultados

### I. Supervivencia e infectividad

La supervivencia de *P. nicotianae* fue inferior en comparación con las dos primeras campañas, solo se detectó el inóculo en el 29 % de las muestras analizadas. El siguiente modelo se obtuvo a partir del análisis mediante regresión logística de los resultados obtenidos y permite estimar la probabilidad de supervivencia del inóculo.

$$\text{Supervivencia} = \frac{e^{-0,64-1,44z_{T.TC1}-2,19z_{T.TC2}}}{1 + e^{-0,64-1,44z_{T.TC1}-2,19z_{T.TC2}}}$$

Siendo T.TC1 y T.TC2 los tratamientos testigo con adición de torta de colza, a razón de 7.000 kg·ha<sup>-1</sup>(TC1) y 14.000 kg·ha<sup>-1</sup>(TC2), y cubiertos con plástico.

El modelo es útil para predecir la probabilidad de supervivencia del inóculo ya que reduce significativamente la desviación (P<0,05) y el análisis de los residuos indica que no existe una pérdida de ajuste significativa. De todas las variables explicativas, solamente dos tratamientos influyeron significativamente (P<0,05) en el descenso de la supervivencia del inóculo: Testigo + TC1 +Plástico y Testigo + TC2 + Plástico. Estos redujeron la probabilidad de supervivencia del inóculo 1,44 y 2,19 veces, respectivamente.

En relación a la variable infectividad, el 39,50 % de las muestras analizadas mediante bioensayo presentaron enfermedad. El modelo obtenido por regresión logística fue igual a:

$$\text{Infectividad} = \frac{e^{-0,429}}{1 + e^{-0,429}}$$

Este modelo es el que mejor se adapta a los resultados de los bioensayos, pero ni los tratamientos aplicados ni profundidad influyeron significativamente (P<0,05) en la reducción de la infectividad del inóculo. No obstante, a pesar de no ser significativo el efecto de los tratamientos al nivel de significación

considerado, se observó que aquellos tratamientos en los que se añadió torta de colza presentaron menor número plantas enfermas.

La tabla de contingencia (Tabla 3.5) permite estudiar la relación entre las variables supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* en la campaña 2010-2011.

**Tabla 3.5.** Tabla de contingencia para estudiar la relación entre la supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* durante la campaña 2010-2011.

Infectividad	Supervivencia	
	0	1
0	100	9
1	26	43

Para conocer si existía relación entre las variables estudiadas se realizó un contraste de hipótesis mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson. Según los resultados de este contraste, las variables supervivencia y la infectividad están relacionadas significativamente ( $\chi^2$  Pearson = 59,72;  $P < 0,05$ ). De hecho, cuando hay supervivencia del inóculo, se estima que en el 82,70 % de los casos existe infectividad.

El grado de relación entre ambas variables se calculó por el coeficiente de contingencia de Pearson ( $C=0,50$ ), estimándose que las variables supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* están relacionadas en un 71 % en esta campaña.

## II. Temperatura

Las temperaturas registradas en esta campaña fueron mayores que en el resto de campañas. A 15 cm de profundidad, las temperaturas medias fueron superiores a 25 °C en algunos tratamientos (Tabla 3.6). Las temperaturas máximas alcanzadas estuvieron comprendidas entre 37,8 °C (Testigo + TC2+ P, 15 cm) y 23,4 °C (Testigo, 30 cm).

El análisis de la varianza a dos vías (tratamiento y profundidad) mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para el factor tratamiento ( $F = 23,57$ ) y profundidad ( $F = 27,00$ ) y la interacción de estos factores no fue significativa ( $F = 0,31$ ). El test de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher diferenció cuatro grupos homogéneos para el factor tratamiento, como puede observarse en la Tabla 3.6. En relación al factor profundidad, se diferenciaron dos grupos homogéneos. La temperatura a 15 cm fue significativamente mayor ( $24,2 \pm 3,7$  °C) que a 30 cm ( $22,9 \pm 3,4$  °C).

**Tabla 3.6.** Temperatura media del suelo  $\pm$  desviación estándar a 15 cm, 30 cm de profundidad y global para los tratamientos ensayados en la primavera de 2011.

Tratamiento	Temperatura (° C)		
	15 cm	30 cm	global
<i>B. nigra</i> + P	24,79 $\pm$ 3,78	23,58 $\pm$ 2,93	24,10 $\pm$ 3,04 c
<i>B. nigra</i> + TC1 + P	24,55 $\pm$ 4,69	23,22 $\pm$ 2,93	23,80 $\pm$ 3,09 c
<i>B. nigra</i> + TC2 + P	25,44 $\pm$ 4,17	23,71 $\pm$ 3,30	24,49 $\pm$ 3,65 cd
<i>S. alba</i> + P	24,20 $\pm$ 4,08	23,41 $\pm$ 3,08	23,71 $\pm$ 3,19 c
<i>S. alba</i> + TC1 + P	26,13 $\pm$ 4,37	24,74 $\pm$ 3,53	25,33 $\pm$ 3,67 d
<i>S. alba</i> + TC2 + P	25,10 $\pm$ 3,77	23,94 $\pm$ 3,28	24,42 $\pm$ 3,49 cd
Testigo	19,12 $\pm$ 2,99	18,69 $\pm$ 2,06	18,87 $\pm$ 2,11 a
Testigo + P	25,02 $\pm$ 3,91	23,28 $\pm$ 2,80	24,06 $\pm$ 3,06 c
Testigo + TC1 + P	22,93 $\pm$ 3,35	21,99 $\pm$ 2,58	22,38 $\pm$ 2,75 b
Testigo + TC2 + P	25,17 $\pm$ 5,05	23,64 $\pm$ 3,24	24,33 $\pm$ 3,60 cd

Los tratamientos seguidos de las mismas letras no difieren estadísticamente de acuerdo al test LSD ( $P > 0,05$ ).

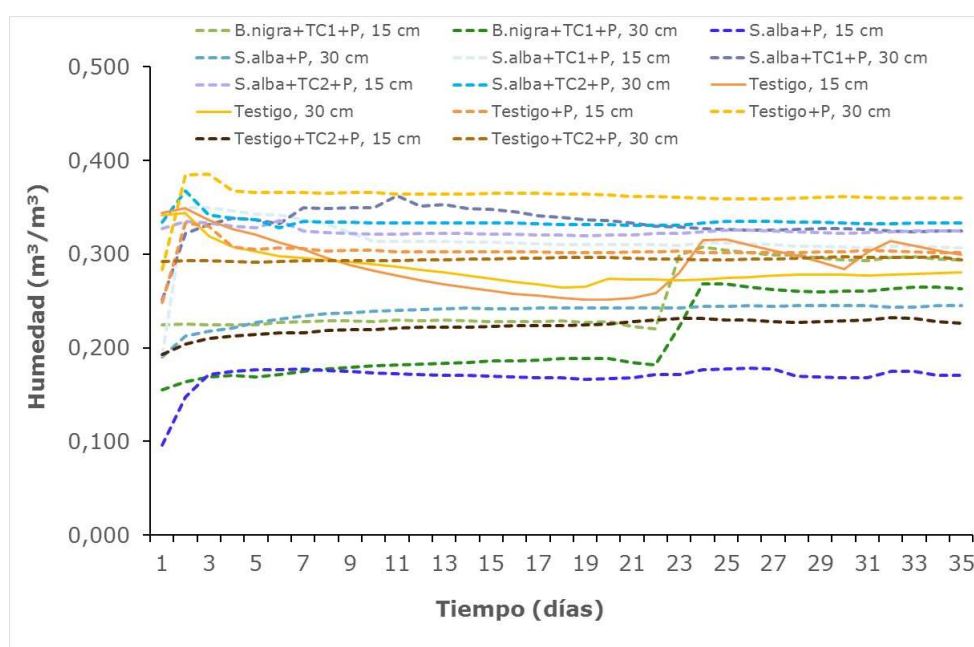
TC1: Torta de Colza, 7.000 kg·ha<sup>-1</sup>; TC2: Torta de Colza, 14.000 kg·ha<sup>-1</sup>

En esta campaña, el 36,6 % del tiempo de aplicación de los tratamientos las temperaturas fueron superiores a 25 °C. El tratamiento Testigo destacó por tener temperaturas inferiores a 25 °C, aproximadamente el 100 % del tiempo. El tratamiento *S. alba* + TC1 + P a 15 cm presentó el mayor número de horas acumuladas en el intervalo 25 - 35 °C. Además, algunos tratamientos superaron los valores de 35 °C pero no sobrepasaron los 40 °C. Estos tratamientos fueron: Testigo + TC2 + P a 15 cm (35 h), *S. alba* + TC1 + P (15,5 h) y *B. nigra* + TC1 + P (21,5 h).

### III. Humedad

El contenido de humedad del suelo fue más o menos constante durante periodo de estudio para todos los tratamientos y, en general, los tratamientos presentaron un mayor contenido de humedad a 30 cm (Figura 3.13).

Los valores medios del contenido de humedad variaron entre 0,171 y 0,364  $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ , equivalentes al 38,4 % y 81,8 % de saturación del suelo. Los tratamientos Testigo + P (30 cm) y *S. alba* + P (15 cm) presentaron el mayor y menor contenido de humedad, respectivamente.



**Figura 3.13.** Evolución de la humedad volumétrica ( $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ) en los tratamientos evaluados durante la primavera de 2011.

### C.2. Discusión

En la tercera campaña, a diferencia del resto de campañas, la supervivencia del inóculo fue menor. Solamente dos tratamientos influyeron significativamente en la reducción de la probabilidad de supervivencia del inóculo de *P. nicotianae*. Estos fueron los tratamientos testigo en los que se había incorporado torta de colza y, posteriormente, habían sido cubiertos con plástico. El tratamiento testigo

más efectivo fue en el que se había aplicado la mayor dosis de torta de colza ( $14.000 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ).

La disminución general de la supervivencia se podría explicar por la existencia de temperaturas más elevadas a las de campañas anteriores, y por otra parte, por la aplicación de la torta de colza. Mazzola (2011) indicó que la biofumigación con harina de semilla de brásicas suprimió la proliferación de *M. phaseolina* en el suelo.

El tratamiento Testigo + TC2 + P presentó el menor número de muestras que dieron positivo en la detección del inóculo. Asimismo, este tratamiento fue el que presentó la temperatura máxima ( $37,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), la mayor temperatura media ( $24,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y el mayor número de horas acumuladas entre  $35\text{-}40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (35 h). Estas temperaturas superiores pudieron incrementar la liberación de compuestos tóxicos para el inóculo y debilitar el patógeno. En este mismo sentido, el debilitamiento de propágulos por la exposición a temperaturas subletales ha sido reportado para varios patógenos de plantas (Blok y Bollen, 1995).

Además, en esta campaña la supervivencia (29 %) fue menor a la infectividad (39,5 %) a diferencia de las campañas anteriores. Los tratamientos ensayados no influyeron significativamente en la infectividad del inóculo de *P. nicotianae*. Aunque cabe señalar que, en general, los tratamientos con adición de torta de colza presentaron menor infectividad. Wang *et al.* (2014) observaron que la biofumigación con torta de colza redujo la infectividad causada por *P. capsici* en el cultivo de pimiento debido a la alteración de la estructura de la comunidad microbiana del suelo.

En esta campaña, por una parte la supervivencia fue menor que la incidencia de la enfermedad y, por otra parte, el análisis estadístico mostró que las variables estudiadas, supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae*, estaban muy relacionadas (71 %).

En la primera campaña estas variables no estaban relacionadas, el inóculo estaba presente en el suelo pero apenas produjo enfermedad, este hecho puede ser atribuido a diferentes causas: bien porque el inóculo estaba debilitado por la temperatura o los compuestos tóxicos del material biofumigante, bien por la supresividad del suelo, consecuencia de las interacciones entre los componentes de la microbiota edáfica.

Por último, es importante mencionar que la profundidad no influyó significativamente en la supervivencia e infectividad del inóculo, a pesar de que las temperaturas medias y los contenidos de humedad fueron diferentes a 15 y 30 cm. Ansani y Matsuoka (1983), Bowers *et al.* (1990) señalaron que la profundidad del suelo a la que fue enterrado el inóculo de *P. capsici* en sus ensayos no fue determinante en la supervivencia del mismo.

#### **D. Campaña 2011-2012**

A diferencia del resto de campañas, en esta campaña se sembró una mezcla biofumigante que contenía el 50 % de semillas de *B. nigra* y el 50 % de *S. alba*, y la dosis de siembra fue de 12,5 kg·ha<sup>-1</sup> para las dos especies. La siembra se realizó el 19 de octubre de 2011, prolongándose el cultivo hasta finales de marzo de 2012. En el momento de la incorporación de la mezcla biofumigante al suelo se añadieron: torta de colza a razón de 14.000 kg·ha<sup>-1</sup> (TC) y pellets de *Brassica carinata* (BioFence®) a razón de 3.000 kg·ha<sup>-1</sup>. Los tratamientos ensayados fueron: 1) Mezcla biofumigante + BioFence® / Mezcla biofumigante + BioFence® + Plástico / Mezcla biofumigante + TC / Mezcla biofumigante + TC + Plástico; 2) Testigo / Testigo + Plástico / Testigo + BioFence® / Testigo + BioFence® + Plástico / Testigo + TC / Testigo + TC + Plástico.



La producción media  $\pm$  desviación estándar ( $n=16$ ) de la mezcla biofumigante fue de  $2,07 \pm 0,60 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-2}$  (materia verde) y  $0,47 \pm 0,13 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-2}$  (materia seca). Los estados fenológicos de la mezcla biofumigante fueron 5.0 (silicuas marrones quebradizas, tallos secos) y 4.1 (semillas verdes en silículas inferiores) para *B. nigra* y *S. alba*, respectivamente. Los cultivos se incorporaron al suelo el 27 de marzo mediante pase de rotovator, sobre estos se añadió torta de colza y los pellets de BioFence® que fueron enterrados con otro pase de rotovator. Posteriormente, se sellaron las parcelas con riego por aspersión durante dos horas y se colocaron los plásticos en las parcelas correspondientes.

La finalización de los tratamientos tuvo lugar el 10 de mayo de 2012 con el levantamiento de los plásticos y desenterrado de sondas. Un día después se recogieron las muestras de suelo para su análisis químico. Además, en esta campaña se recogieron muestras de suelo para comparar los análisis de la microbiota fúngica antes y después de los tratamientos.

La cuarta semana del mes de mayo se hizo el trasplante de pimiento en 2012 y el 24 de septiembre se hicieron las medidas de producción de pimiento.

El cronograma de las actividades realizadas en esta campaña se representa en la Figura 3.14.

## Evaluación de técnicas para el control de *P. nicotianae* en condiciones de campo



**Figura 3.14.** Cronograma de las principales actividades realizadas en la Campaña 2011-2012.

## D.1. Resultados

### I. Supervivencia e infectividad

La supervivencia del inóculo de *P. nicotianae* fue muy alta, en torno al 88 %. El modelo obtenido por regresión logística es válido para estimar la probabilidad de supervivencia es el siguiente:

$$\text{Supervivencia} = \frac{e^{1,81 + 1,62Z_{T.TC} + 13,8Z_{T.TC.P}}}{1 + e^{1,81 + 1,62Z_{T.TC} + 13,8Z_{T.TC.P}}}$$

Siendo T.TC y T.TC.P los tratamientos testigo con adición de torta de colza (14.000 kg·ha<sup>-1</sup>), sin y con plástico, respectivamente.

De todas las variables explicativas, solamente dos tratamientos influyeron significativamente (P<0,05) en la supervivencia del inóculo. Los tratamientos Testigo + TC y Testigo + TC + Plástico incrementaron la probabilidad de supervivencia del inóculo 1,62 y 13,80 veces, respectivamente.

En relación a la variable infectividad, esta campaña presentó los valores más bajos, solo aproximadamente el 17 % de las muestras analizadas presentaron enfermedad. El modelo obtenido por regresión logística fue igual a:

$$\text{Infectividad} = \frac{e^{-1,68 + 0,89Z_{T.TC.P}}}{1 + e^{-1,68 + 0,89Z_{T.TC.P}}}$$

Este modelo es el que mejor se adapta a los resultados de los bioensayos, solo el tratamiento Testigo + TC + P influyó significativamente (p<0,05), pero con un efecto negativo ya que aumentó 0,89 veces la probabilidad de que el inóculo produzca enfermedad. El resto de tratamientos y la profundidad no influyeron significativamente (P<0,05) en la infectividad del inóculo de *P. nicotianae*.

La relación entre las variables supervivencia e infectividad del inóculo en la campaña 2011-2012 fueron estudiadas a partir de la tabla de contingencia (Tabla 3.7).

**Tabla 3.7.** Tabla de contingencia para estudiar la relación entre la supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* durante la campaña 2011-2012.

Infectividad	Supervivencia	
	0	1
0	33	231
1	4	50

Para conocer si existía relación entre las variables estudiadas se realizó un contraste de hipótesis mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson. Según los resultados de este contraste, las variables supervivencia y la infectividad no están relacionadas significativamente ( $\chi^2$  Pearson = 1,13;  $P > 0,05$ ). A pesar de que la supervivencia global del inóculo fue muy elevada, la infectividad no presentó valores altos. Solamente se produce infectividad en el 17,8 % de los casos en los que se detecta el inóculo en el suelo.

## II. Temperatura

En general, las temperaturas medias y temperaturas máximas fueron superiores a 15 cm. Las temperaturas máximas oscilaron entre 30,4 °C (Mezcla Biofumigante + TC + P, 15 cm) y 23,2 °C (Testigo + BioFence®, 15 cm).

El análisis de la varianza a dos vías (tratamiento y profundidad) mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de temperatura para los factores tratamiento ( $F = 166,04$ ) y profundidad ( $F = 30,20$ ). Sin embargo, la interacción de ambos factores no fue significativa ( $F = 1,78$ ). El test de mínima diferencia significativa (LSD) agrupó las temperaturas en cuatro grupos homogéneos para el factor tratamiento (Tabla 3.8). Los tratamientos con plástico presentaron una temperatura significativamente superior que los tratamientos sin plástico, como puede observarse en la Tabla 3.8. En relación al factor profundidad, el test LSD agrupó las temperaturas en dos grupos homogéneos. La temperatura a 15 cm

( $18,1 \pm 2,9$  °C) fue significativamente mayor que la temperatura a 30 cm ( $17,5 \pm 2,5$  °C).

**Tabla 3.8.** Temperatura media del suelo  $\pm$  desviación estándar a 15 cm, 30 cm de profundidad y global para los tratamientos ensayados en la primavera de 2012.

Tratamiento	Temperatura (° C)		
	15 cm	30 cm	global
MB + BioFence	$15,66 \pm 2,28$	$15,36 \pm 1,45$	$15,6 \pm 1,6$ a
MB + BioFence + P	$19,67 \pm 3,16$	$19,14 \pm 1,61$	$19,5 \pm 1,5$ b
MB + TC	$15,59 \pm 2,34$	$15,82 \pm 1,29$	$15,8 \pm 1,6$ a
MB + TC + P	$20,68 \pm 2,87$	$19,55 \pm 1,86$	$20,2 \pm 1,8$ c
Testigo	$16,25 \pm 2,50$	$15,44 \pm 1,38$	$15,9 \pm 1,6$ a
Testigo + P	$19,55 \pm 2,64$	$18,78 \pm 1,70$	$19,2 \pm 1,5$ b
Testigo + BioFence	$15,72 \pm 2,30$	$15,55 \pm 1,43$	$15,7 \pm 1,5$ a
Testigo + BioFence + P	$19,49 \pm 2,44$	$18,67 \pm 1,44$	$19,1 \pm 1,5$ b
Testigo + TC	$16,04 \pm 2,78$	$15,62 \pm 1,37$	$15,9 \pm 1,6$ a
Testigo + TC + P	$21,88 \pm 2,99$	$20,55 \pm 2,24$	$21,3 \pm 2,3$ d

Los tratamientos seguidos de las mismas letras no difieren estadísticamente de acuerdo al test LSD ( $P > 0,05$ ).

MB: Mezcla Biofumigante (50 % *B. nigra* + 50 % *S. alba*); TC: Torta de Colza, 7.000 kg·ha<sup>-1</sup>; BioFence®: pellets de *B. carinata*, 3.000 kg·ha<sup>-1</sup>

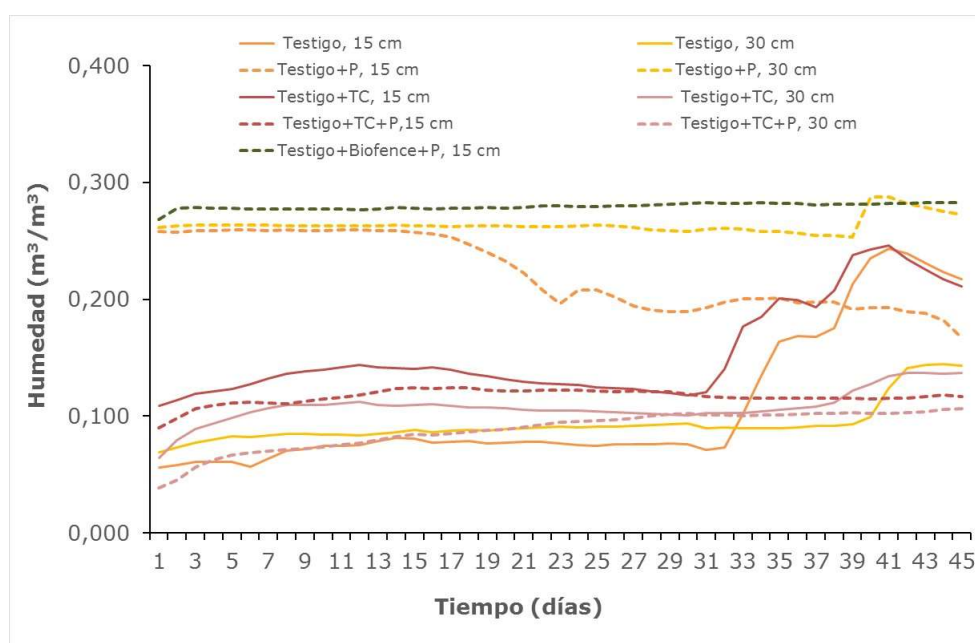
En esta campaña solo un 1,7 % del tiempo la temperatura fue superior a 25 °C y no se registraron valores superiores a 35 °C en ningún tratamiento. El tratamiento Testigo + TC + P presentó el mayor número de horas acumuladas en el intervalo 25 -35 °C a 15 cm (142,5 h).

### III. Humedad

Debido al elevado número de tratamientos e insuficiente número de sondas no se pudo registrar la humedad del suelo de todos los tratamientos, además una de las sondas presentó problemas (Testigo + BioFence® + P a 30 cm), con lo cual no hay datos relativos a este tratamiento.

En la Figura 3.15 se representa la evolución de la humedad del suelo de algunos de los tratamientos evaluados en la primavera de 2012. La humedad volumétrica media estuvo comprendida entre 0,089 y 0,280 m<sup>3</sup>·m<sup>-3</sup>, equivalentes al 21,0 % y 66,2 % de saturación del suelo. El tratamiento Testigo + BioFence®

+ P (15 cm) presentó un mayor y constante contenido de humedad durante el periodo de estudio.



**Figura 3.15.** Evolución del contenido de humedad en el suelo ( $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ) registrada en los tratamientos evaluados en la primavera de 2012.

En contraste con otras campañas, la mayoría de los tratamientos mostraron mayores valores de humedad a 15 cm. En general, los tratamientos con plástico fueron los que presentaron menor variación en el contenido de humedad y esta variación fue mayor a 15 cm.

La humedad de los tratamientos sin plástico se mantuvo más o menos constante en los primeros 33 días, a partir de ese momento hubo un incremento acusado en los tratamientos a 15 cm, mientras que a 30 cm solo tuvo lugar un ligero aumento.

## D.2. Discusión

En la última campaña, los valores de supervivencia fueron muy altos (88 %) y solo dos de los tratamientos aplicados (Testigo + TC y Testigo + TC + P) influyeron en la supervivencia del inóculo. En contraste con las anteriores

campañas, estos dos tratamientos incrementaron la probabilidad de supervivencia.

Durante la aplicación de los tratamientos, las temperaturas medias registradas fueron menores que en el resto de las campañas, y solo durante el 1,7 % del tiempo la temperatura estuvo comprendida entre 25 °C y 35 °C. La humedad volumétrica media fue inferior a otras campañas, equivalentes al 21,0 % y 66,2 % de saturación del suelo. Estas condiciones de temperatura y humedad junto con los nutrientes aportados por la torta de colza pudieron favorecer la multiplicación del inóculo, incrementándose la supervivencia del mismo.

El cultivo de especies (*B. nigra* + *S. alba*) y su posterior incorporación, junto a materiales como torta de colza o BioFence® no redujeron la supervivencia del inóculo. Como ya se ha dicho anteriormente, la torta de colza aumentó la supervivencia en los tratamientos testigos y la aplicación de BioFence® no mejoró los resultados. En este sentido, Gilardi *et al.* (2014) concluyeron que el uso de pellets de *B. carinata* fueron ineficaces para el control de *P. nicotianae* en plantas de tomate. Rodríguez-Molina *et al.* (2015) observaron que la biofumigación con BioFence® en Extremadura no tuvo ningún efecto en la supervivencia del inóculo de *P. nicotianae* ni en primavera ni en verano.

En relación a la infectividad del inóculo, destaca la baja incidencia media de la enfermedad (17 %) a pesar de la alta supervivencia del inóculo. En el tratamiento Testigo + TC + P se observó una mayor infectividad del inóculo. Por el contrario, del resto de los tratamientos aplicados, ninguno redujo de forma significativa la incidencia de la enfermedad en las plantas del bioensayo. La adición de BioFence® no disminuyó la infectividad en este ensayo de campo. Sin embargo, otros autores señalaron que la aplicación de BioFence® es muy útil en la reducción de la infectividad del inóculo. Domínguez *et al.* (2014) observaron que la biosolarización con pellets de *B. juncea* redujo el porcentaje de plantas enfermas de fresa con respecto al tratamiento control. Núñez-Zofío *et al.* (2011) obtuvieron una reducción del 93 % de la infectividad de *P. capsici* en el cultivo de pimiento al aplicar BioFence® y *S. alba*.

En esta campaña, las variables infectividad y supervivencia no mostraron relación entre ellas. El inóculo está presente pero es incapaz de producir enfermedad, por estar debilitado o porque el suelo se comporta como un suelo supresivo por la alteración de la comunidad microbiana al incorporar materiales biofumigantes. Estos resultados concuerdan con los de Wang *et al.* (2014) que señalaron que la correlación entre la incidencia de la enfermedad en pimiento y la población de *P. capsici* era muy baja.

En las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización la temperatura es un factor decisivo, ya que influye en la inactivación del inóculo y en la emisión de compuestos a partir del material biofumigante (abono verde, harina de semilla, pellets). En general, los tratamientos biofumigantes no tuvieron efecto significativo en la disminución de la supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae*. Son varios los factores que afectan a la eficacia del material biofumigante como el potencial biofumigante, la biomasa, parte de la planta y estado fenológico. Además, se ha demostrado que la hidrólisis de los GSLs y la formación de ITCs en el suelo son dependientes del nivel de maceración del material vegetal, de la actividad de la mirosinasa, de la humedad del suelo y de la temperatura (Rodríguez-Molina *et al.*, 2015). La humedad es esencial para la actividad de la mirosinasa y liberación de ITCs. Morra y Kirkegaard (2002) demostraron que los suelos anegados doblaron la concentración de ITCs liberados por el material biofumigante incorporado al suelo. Además, la humedad influye en la supervivencia del inóculo, Coelho *et al.* (2001) detectaron que la supervivencia de las clamidosporas de *P. nicotianae* era menor en suelos saturados que en suelos húmedos.

En ninguna de las campañas, ningún tratamiento de biofumigación, biosolarización y solarización consiguió reducir la supervivencia e infectividad del inóculo al 100 %. En base a estos resultados, se deduce que estas técnicas no son válidas para desinfectar los suelos en Extremadura durante la primavera. La humedad fue constante en los tratamientos con plástico y variable en los tratamientos sin plástico, pero nunca inferior al 20 %. El adecuado contenido de



humedad pudo favorecer tanto la actividad de la mirosinasa como la supervivencia del inóculo. Las bajas temperaturas fueron el principal factor limitante de la eficacia de las diferentes técnicas. Rodríguez-Molina *et al.* (2015) compararon la supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* sometido a diferentes tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización en condiciones de campo en Extremadura en dos estaciones del año (primavera y verano). La supervivencia fue mayor en primavera (>78 %) que en verano (<50,5 %). Estos autores concluyeron que la temperatura del suelo es el principal factor en la inactivación del inóculo de *P. nicotianae* en verano, especialmente cuando se cubren las parcelas con plástico. En los meses de julio y agosto de 2013 se registraron temperaturas medias superiores (> 29 °C) a las obtenidas en primavera. Las temperaturas máximas variaron entre 30,9 °C y 48,6 °C, y el tratamiento Testigo + Plástico registró temperaturas superiores a 40 °C durante 396 horas a 15 cm.

Las variables supervivencia e infectividad presentaron una relación muy alta en la Campaña 2010-2011; cuando el inóculo sobrevive se estima que en el 82,7 % de los casos existe infectividad. En el resto de campañas la relación entre ambas variables no existió, contrastaron los elevados valores de la supervivencia del inóculo con los bajos valores de infectividad. Es posible que la densidad del inóculo después de los tratamientos hubiera descendido a niveles residuales, demasiado bajos para producir infección en las plantas de pimiento, a pesar de ser detectable por las trampas vegetales. El número de clamidosporas de *P. nicotianae* necesarias para producir daño en las plantas de pimiento no ha sido reportado, varios estudios indicaron que la relación entre la densidad del inóculo y la incidencia de la enfermedad dependen de varios factores (Mitchell y Kannwisher-Mitchell, 1983). Asimismo, las clamidosporas producidas en condiciones de laboratorio pueden diferir en gran medida de las producidas en el medio natural en relación a la germinación, la supervivencia y el número de clamidosporas necesario para producir infección (Mitchell y Kannwisher-Mitchell, 1983). Hay varios factores que pudieron reducir la infectividad, no solo el debilitamiento del inóculo por la aplicación de los tratamientos, sino también, por

los cambios inducidos en las propiedades microbiológicas y químicas del suelo. La aplicación de materia orgánica incrementa la actividad microbiana que ayuda a controlar los patógenos de suelo a través de la competencia, antibiosis, parasitismo/depredación... (Janvier *et al.*, 2007). Kruger *et al.* (2013) indicaron que la biofumigación tiene un efecto en la actividad biológica del suelo, incrementa la población de organismos antagonistas que podrían conducir a la supresión de los organismos fitopatógenos. A mayor diversidad en el suelo mayor es la capacidad de autorregulación (mayor supresividad), lo que dificulta el establecimiento y desarrollo de organismos patógenos (Garbeva *et al.*, 2004). Núñez-Zofío *et al.* (2011) atribuyeron la reducción de la incidencia de enfermedad por *P. capsici* a la supresividad inducida por un incremento de la actividad y diversidad microbiana. Mazzola *et al.* (2007) sugirieron que la supresión de la pudrición de raíz en manzano (causada por *Rhizoctonia* spp.) estuvo asociada a la proliferación de *Streptomyces* spp. en el suelo después de la incorporación de harinas de semilla de brásicas.

### **3.6. Efecto de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización en las propiedades físico-químicas del suelo y su productividad**

La adición de materia orgánica al suelo al modo tradicional, en forma de estiércoles u otros residuos orgánicos generados en las propias explotaciones agrícolas y ganaderas, a fin de mejorar la fertilidad del mismo y restituir los elementos nutritivos extraídos por los cultivos, ha ido perdiendo importancia al buscarse mayores rendimientos de producción. La práctica de la agricultura intensiva conlleva la reducción de los niveles de materia orgánica en el suelo y la degradación de la estructura del mismo, con aumento también de su compactación y exaltación de los fenómenos erosivos (Tortosa, 2009).

La degradación del suelo provoca alteraciones en la fertilidad y, consecuentemente, en su capacidad de sostener una agricultura productiva. La productividad del suelo está relacionada con un gran número de factores

limitantes, físicos y químicos, que de una manera general componen la fertilidad del suelo (FAO, 1993). Algunos autores (USDA, 1981; El Swaify y Dangler, 1982; Schertz, 1985) clasifican los factores responsables del descenso de la productividad por erosión del suelo en dos grupos: 1) disminución de los contenidos de materia orgánica y nutrientes; 2) degradación de la estructura del suelo y disminución de la capacidad de retención de agua.

La biofumigación con material fresco de especies de *Brassicaceae* y los sistemas de rotación incrementan la materia orgánica del suelo, mejoran la estructura y controlan la erosión (Matthiessen y Shackleton, 2005). Tello *et al.* (2010) estudiaron los efectos de las técnicas de biofumigación y biosolarización en ensayos de campo, observando el papel beneficioso de estas en las propiedades físico-químicas del suelo y en la producción de los cultivos. Estos autores concluyeron que el vigor de las plantas del cultivo posterior y su producción comercial eran equiparables a los resultados obtenidos sobre los cultivos tratados con fumigantes químicos.

### **3.6.1. Propiedades físicas del suelo**

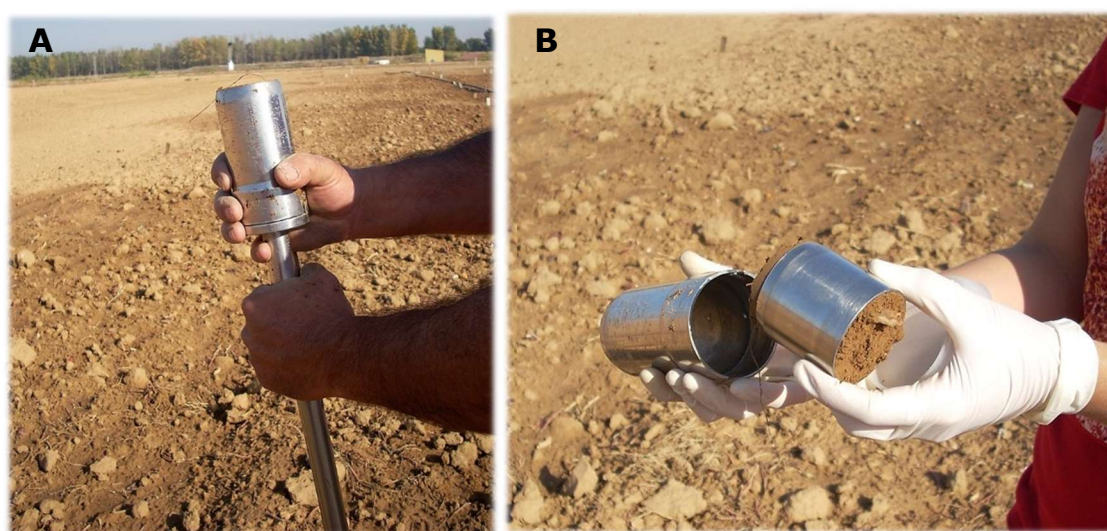
#### **3.6.1.1. Material y métodos**

Para determinar las características físicas del suelo, de gran influencia en el desarrollo y producción de los cultivos, se evaluaron dos propiedades físicas *in situ* en cada una de las parcelas: densidad aparente y resistencia a la penetrabilidad. Estas dos propiedades físicas se utilizan como índices para caracterizar la compactación de los suelos (Forsythe, 1985; Henríquez y Cabalceta, 1999). La compactación del suelo reduce la porosidad total, la macroporosidad, la aireación, la capacidad de infiltración (Dias Junior y Pierce, 1996) y la conductividad hidráulica saturada (Silva *et al.*, 2009). Además, incrementa la resistencia a la penetración de la raíz (Moraes *et al.*, 2012) y limita la profundidad y el volumen del suelo explorado por las raíces de las plantas (Bergamin *et al.*, 2010).

### 3.6.1.1.1. Densidad aparente

La densidad aparente tiene interés desde el punto de vista del manejo del suelo, ya que informa sobre la compactación de cada horizonte y permite inferir las dificultades para la emergencia, el enraizamiento y la circulación del agua y el aire (Porta *et al.*, 1999).

Las muestras de densidad aparente se cogieron de forma aleatoria con una sonda de muestras inalteradas Eijkelkamp (método del cilindro metálico) en cada una de las parcelas por duplicado. Esta sonda (Figura 3.16.A) consta de un cilindro metálico en el extremo inferior en cuyo interior alberga un cilindro removible de 5 cm de altura que encaja a 3 cm de su tope superior. En la Figura 3.16.B se puede observar el cilindro de 100 cm<sup>3</sup> con la muestra de suelo. Las muestras de tierra se enrasaron cortando con un cuchillo el suelo excedente por arriba y por debajo. Una vez recogidas todas las muestras de las parcelas, se pesaron en el laboratorio y desecaron a 105 °C durante 24 horas, pasadas otras 24 horas se volvieron a pesar para estimar la humedad y así, poder calcular la densidad aparente de las muestras (Blake y Hartge, 1986). Los datos de densidad aparente se expresaron en g·cm<sup>-3</sup>.



**Figura 3.16.** **A.** Sonda de muestras inalteradas *Eijkelkamp* para evaluar la densidad aparente del suelo (Esta tesis). **B.** Cilindro de 100 cm<sup>3</sup> en cuyo interior se encuentra la muestra de suelo inalterada (Esta tesis).

### 3.6.1.1.2. Resistencia a la penetrabilidad

La resistencia a la penetrabilidad del suelo es un indicador de la calidad física del suelo, el límite crítico de 2 MPa ha sido ampliamente usado para caracterizar esta calidad en sistemas convencionales y sin labranza (Moraes *et al.*, 2014). La resistencia a la penetrabilidad refleja el poder de las raíces para penetrar en el suelo (Yustika y Muchtar, 2016). Pabin *et al.* (1998) y Stelluti *et al.* (1998) indicaron la estrecha correlación que existe entre la resistencia a la penetrabilidad y la elongación de la raíz, y entre la resistencia a la penetrabilidad y la producción.

Las medidas de resistencia a la penetrabilidad se realizaron con un penetrómetro manual *Eijkelkamp* de forma aleatoria en tres puntos de cada parcela a una profundidad de 5-45 cm. Los datos se expresaron en  $\text{N}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Bianchini *et al.* (2002) demostraron que el uso del penetrómetro es un método práctico y fiable práctico para caracterizar la compactación del suelo y estimar la resistencia que ofrece el suelo al crecimiento de las raíces.

### 3.6.1.2. Análisis de los datos

El análisis estadístico de los datos referentes a la densidad aparente se realizó con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.II. (Statistical Graphics Corp.). Estos datos fueron analizados usando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, debido a que los datos no cumplían los requisitos de normalidad y homocedasticidad.

Los datos relativos a la resistencia a la penetrabilidad fueron analizados mediante el Análisis de la Covarianza (ANCOVA) con el programa estadístico R versión 3.5.1. El ANCOVA hace uso del análisis de la varianza y de la regresión lineal.

### 3.6.1.3. Campañas

Las medidas de la densidad aparente y resistencia a la penetrabilidad se realizaron al inicio de cada campaña cuando el suelo presentaba un contenido de humedad idóneo para realizar las mediciones (humedad a capacidad de campo). En la Tabla 3.9 se especifican las fechas y los tratamientos en cuyas parcelas se realizaron las mediciones de ambas variables para cada campaña.

**Tabla 3.9.** Tratamientos en cuyas parcelas se realizaron las medidas de densidad aparente y resistencia a la penetrabilidad, fecha de medida y campaña.

Campaña	Fecha	Densidad aparente	R. Penetrabilidad
2008-2009	febrero 2009	Testigo, Testigo + P	Testigo, Testigo + P
2009-2010	octubre 2009	Bloque 2*, Testigo, Testigo + P	Todos*
2010-2011	octubre 2010	Bloque 2*, Testigo, Testigo + P	Todos*
2011-2012	octubre 2011	Todos**	Todos**

\*Tratamientos Bloque 2: *B. carinata*, *B. carinata* + P, *B. nigra*, *B. nigra* + P; *B. oleracea*, *B. oleracea* + P, *S. alba*, *S. alba* + P, Testigo, Testigo + P.

\*\*Tratamientos: *B. nigra* + P, *B. nigra* + TC1 + P, *B. nigra* + TC2 + P, *S. alba* + P, *S. alba* + TC1 + P, *S. alba* + TC2 + P, Testigo, Testigo + P, Testigo + TC1 + P, Testigo + TC2 + P.

TC1: Torta de colza, a razón de 7.000 kg·ha<sup>-1</sup>; TC2: Torta de colza, a razón de 14.000 kg·ha<sup>-1</sup>

## A. Campaña 2008-2009

En la Campaña 2008-2009, las mediciones no se pudieron realizar en octubre debido a las continuas lluvias, por ello, se pospusieron al mes de febrero. Las mediciones de la densidad aparente y resistencia a la penetrabilidad se hicieron por triplicado en las parcelas de los tratamientos Testigo y Testigo + P.

### A.1. Resultados

#### I. Densidad aparente

El valor medio de la densidad aparente  $\pm$  desviación estándar (n=24) fue igual a  $1,70 \pm 0,08$  g·cm<sup>-3</sup>. Los valores máximo y mínimo fueron 1,79 y 1,46 g·cm<sup>-3</sup>, respectivamente.

## II. Resistencia a la penetrabilidad

En esta fecha, las medidas obtenidas fueron analizadas mediante el análisis de regresión lineal simple. Este análisis permite establecer la relación entre la variable dependiente (resistencia a la penetrabilidad) y la variable explicativa (profundidad). El modelo que relaciona ambas variables es el siguiente:

$$\text{Resistencia a la Penetrabilidad (N} \cdot \text{cm}^{-2}) = 106,24 + 2,69 \cdot \text{profundidad (cm)}$$

De acuerdo a este modelo, la profundidad influye significativamente en la resistencia ( $t_{\text{student}}=3,89$ ,  $P<0,05$ ) en la resistencia a la penetrabilidad, por término medio, cada 1 cm de incremento de la profundidad se produce un incremento de 2,69 en la resistencia.

Este modelo es apropiado para modelizar los datos obtenidos ( $F=15,16$ ;  $P<0,05$ ) pero no es útil para predecir la resistencia a la penetrabilidad en función de la profundidad puesto que esta solo influye en la variable respuesta en un 12,02 % ( $R^2$ ). Esta baja influencia se debe a que existe una gran variabilidad en las mediciones realizadas.

De la observación directa de los datos se determinó que el nivel crítico de 2 MPa para la resistencia a la penetrabilidad se superó a 35 cm.

### A.2. Discusión

La densidad aparente inicial fue elevada ( $1,70 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) con respecto al valor de referencia ( $1,4 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) propuesto por Roquero y Porta (1992) para suelos minerales normales, y por Llera (2011) en función de la textura franco-arenosa del suelo. Cuando los valores de la densidad son altos el suelo presenta dificultades para el paso del agua y de las raíces (Yustika y Muchtar, 2016) afectando al crecimiento y producción final de los cultivos. A pesar de que la densidad presentó un elevado valor, no sobrepasó el valor crítico propuesto por Bowen (1981) ni el propuesto por Taylor y Burnett (1964) que concluyeron que



densidades aparentes de  $1,73 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  y  $1,88 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  fueron limitantes para el crecimiento radicular para una variedad de plantas.

Respecto a la resistencia a la penetrabilidad el nivel crítico de 2 MPa se superó a 35 cm. Los análisis estadísticos mostraron que la profundidad influye significativamente en el incremento de la resistencia. Según Bradford (1986) y Franzén *et al.* (1994), la resistencia a la penetrabilidad incrementa con la profundidad debido al aumento de la fricción de la barra y los valores de las diferentes profundidades están correlacionados entre sí (Campbell y O'Sullivan, 1991). En esta primera fecha, la resistencia aumentó 2,19 unidades por cm que se profundizó. La contribución de la profundidad a la variable respuesta solo fue de un 12,02 % debido a la enorme variabilidad en las mediciones realizadas. Silva *et al.* (2008) indicaron que hay una gran variabilidad de la resistencia a la penetrabilidad para un determinado grado de compactación o coincidencia de valores para diferentes grados de compactación. Esta variabilidad de la resistencia a la penetrabilidad en campo está unida a varias variables dominantes, que incluyen: heterogeneidad del suelo, densidad aparente del suelo (Otto *et al.*, 2011), contenido de agua (Assis *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2012), presión del agua en los poros (Kim *et al.*, 2008), distribución del tamaño de las partículas (Vaz *et al.*, 2012), contenido de arcilla (Molin *et al.*, 2006) y fricción suelo-metal (Dexter *et al.*, 2007).

## **B. Campaña 2009-2010**

En esta campaña las mediciones se realizaron en octubre de 2009. Las medidas de la densidad aparente se realizaron por duplicado en las parcelas del Bloque 2 y de los tratamientos Testigo y Testigo + P. En cuanto a la resistencia a la penetrabilidad, las medidas se realizaron por triplicado en todas las parcelas del ensayo.

### **B.1. Resultados**

#### **I. Densidad aparente**



La densidad aparente media  $\pm$  desviación estándar ( $n=32$ ) fue de  $1,52 \pm 0,09 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  y los valores máximo y mínimo fueron 1,65 y  $1,30 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , respectivamente. El análisis estadístico mediante el test de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas de densidad entre los diferentes tratamientos evaluados ( $H=10,10$ ;  $p=0,34$ ).

## II. Resistencia a la penetrabilidad

Del análisis de la varianza a dos vías (tratamiento y profundidad) de la resistencia a la penetrabilidad se dedujo que no existía interacción entre las variables tratamientos y profundidad ( $P>0,05$ ) (Tabla 3.10). La resistencia a la penetrabilidad varió según la profundidad, independientemente del tratamiento aplicado.

**Tabla 3.10.** Efecto de la profundidad (P), del tratamiento (T) y la interacción profundidad x tratamiento (PxT) en la resistencia a la penetrabilidad en la Campaña 2009-2010. ANOVA con dos factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Profundidad (P)	26.507.417	1	26.507.417	110,67	0
Tratamiento (T)	327.260	9	36.362	1,51	0,14
PxT	139.529	9	15.503	0,64	0,76
Residuos	18.543.932	770	24.083		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

El análisis mediante regresión lineal simple relacionó las variables dependiente (resistencia a la penetrabilidad) e independiente mediante el siguiente modelo:

$$\text{Resistencia a la Penetrabilidad (N} \cdot \text{cm}^{-2}) = -45,22 + 17,81 \cdot \text{profundidad (cm)}$$

La profundidad influye significativamente en la resistencia a la penetrabilidad ( $t_{\text{student}}=33,15$ ;  $P<0,05$ ). Por término medio, cada 1 cm de incremento de la profundidad se produce un incremento de 17,81 en la resistencia.

Este modelo es apropiado para modelizar los datos obtenidos ( $F=1099$ ,  $P<0,05$ ) y la relación entre las dos variables estudiadas es mayor que en la

campaña anterior. En esta campaña la variable profundidad explica un 58,23 % de la resistencia a la penetrabilidad. El resto (41,77 %) de esta variable es explicado por otros factores no tenidos en cuenta en este análisis.

De la observación directa de los datos se determinó que el nivel crítico de 2 MPa para la resistencia a la penetrabilidad se superó a 20 cm.

## **B.2. Discusión**

En esta campaña ninguna de las variables estudiadas, densidad aparente y resistencia a la penetrabilidad, presentaron diferencias significativas entre tratamientos, esto es, los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización no influyeron en estas propiedades físicas del suelo.

La densidad aparente media fue menor que en la campaña anterior. El aporte de materia orgánica por adición de compost, la incorporación de material biofumigante en verde y la rotación con el cultivo de pimiento redujeron la densidad aparente del suelo. La reducción de la densidad aparente por el aporte de materia orgánica ha sido observada por otros autores (Aragon *et al.*, 2000; Gulser y Candemir, 2012; Chaudhari *et al.*, 2013). Usaborisut y Ampanmanee (2015) disminuyeron la densidad aparente al aplicar materia orgánica al suelo al 5 % en peso.

Por lo que se refiere a la resistencia a la penetrabilidad, los tratamientos aplicados no implicaron respuestas diferentes en la variable. La adición de materia orgánica no disminuyó el valor de la resistencia a la penetrabilidad, coincidiendo con los resultados obtenidos por Usaborisut y Ampanmaee (2015). Moraes *et al.* (2014) cuantificaron la influencia de diferentes sistemas de cultivo en la resistencia a la penetrabilidad. Esta resistencia no sufrió modificaciones por la sucesión de cultivos (trigo en invierno-soja en verano) y las rotaciones durante de 4 años.

Solamente la profundidad influyó significativamente en la resistencia, de acuerdo al modelo obtenido por regresión, la resistencia a la penetrabilidad se

incrementó 17,21 unidades por cm de profundidad. La profundidad solo explicó un 58,23 % de la resistencia a la penetrabilidad, por lo que hay otros factores que no fueron considerados en el análisis y que condicionan la resistencia a la penetrabilidad.

### C. Campaña 2010-2011

En la Campaña 2010-2011, las mediciones se realizaron en las mismas parcelas que en la campaña anterior tanto para la densidad aparente como para la resistencia a la penetrabilidad.

#### C.1. Resultados

##### II. Densidad aparente

Los valores de densidad aparente máximo y mínimo fueron 1,74 y 1,28  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , respectivamente. La densidad aparente media  $\pm$  desviación estándar ( $n=32$ ) fue igual a  $1,47 \pm 0,08 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Los resultados del análisis estadístico no mostraron diferencias significativas de densidad para el factor tratamiento ( $H=4,91$ ;  $p=0,842$ ).

##### III. Resistencia a la penetrabilidad

El análisis de la varianza a dos vías (tratamiento y profundidad) de la resistencia a la penetrabilidad mostró que entre las variables tratamiento y profundidad no existía interacción ( $P>0,05$ ) (Tabla 3.11).

**Tabla 3.11.** Efecto de la profundidad (P), del tratamiento (T) y la interacción profundidad x tratamiento (PxT) en la resistencia a la penetrabilidad en la Campaña 2010-2011. ANOVA con dos factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Profundidad (P)	36.250.030	1	36.250.030	1064,17	0
Tratamiento (T)	452.083	9	50.231	1,47	0,15
PxT	537.062	9	59.674	1,75	0,07
Residuos	23.504.236	690	34.064		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Al igual que la campaña anterior, la resistencia a la penetrabilidad varió según la profundidad independientemente del tratamiento aplicado.

El siguiente modelo es producto del análisis de regresión lineal simple de las medidas de resistencia a la penetrabilidad a diferentes profundidades.

$$\text{Resistencia a la Penetrabilidad (N} \cdot \text{cm}^{-2}) = -58,91 + 23,41 \cdot \text{profundidad (cm)}$$

La profundidad influye significativamente en la resistencia a la penetrabilidad ( $t_{\text{student}}=32,37$ ;  $P<0,05$ ). En esta campaña, la resistencia a la penetrabilidad se incrementó 23,41 unidades por cm.

Este modelo es apropiado para modelizar los datos obtenidos ( $F=1048$ ,  $P<0,05$ ) y puede ser útil si se considera que la variable profundidad explica un 59,68 % de la resistencia a la penetrabilidad. Hay otros factores que son importantes e influyentes en la variable objeto de estudio pero que no se han tenido en cuenta en este análisis.

En esta campaña se observó que el nivel crítico de 2 MPa para la resistencia a la penetrabilidad se alcanzó a 15 cm.

## **C.2. Discusión**

La densidad aparente media fue menor que en las campañas anteriores pero tampoco mostró diferencias significativas entre tratamientos. En general, los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización reducen la densidad aparente pero ninguno de los tratamientos es significativamente diferente al resto.

En relación a la resistencia a la penetrabilidad, al igual que en las campañas anteriores, no hubo diferencias de resistencia entre los tratamientos aplicados y solamente la profundidad influyó significativamente. En esta campaña, por cada cm que aumentó la profundidad, la resistencia se incrementó 23,41 unidades. La variable profundidad contribuyó en la variable respuesta en un 59,68 %, de lo

que se deduce que las medidas mostraron gran variabilidad por diversas causas como las diferencias de densidad aparente y humedad, heterogeneidad del suelo, contenido de arcilla, etc.,

Al comparar las ecuaciones de la resistencia a la penetrabilidad en las tres campañas, se observó que el coeficiente de la profundidad se incrementó conforme avanzó el estudio de campo. Los tratamientos aplicados y rotaciones no solo no han mejorado la resistencia sino que han empeorado la situación, ya que en las dos últimas campañas se obtuvieron valores altos de resistencia a una menor profundidad. De hecho, el nivel crítico de 2 MPa se alcanzó a 35 cm en la primera campaña mientras que en la segunda y tercera se superaron a 20 y 15 cm, respectivamente.

Estos resultados discrepan de los obtenidos por Pung *et al.* (2003) que evaluaron el efecto de abonos verdes con brásicas en la resistencia a la penetrabilidad del suelo. Las brásicas (dos especies de mostaza y dos de colza forrajera) disminuyeron la resistencia en la capa superficial del suelo (1,5–21 cm) debido al propio cultivo y sus residuos. Además, la resistencia fue reducida en el subsuelo (25,5–41 cm), hecho atribuible al sistema radicular de estas plantas que pudo romper el profundo y compactado subsuelo.

## **D. Campaña 2011-2012**

En la Campaña 2011-2012 se realizaron mediciones de la densidad aparente (2 medidas·parcela<sup>-1</sup>) y resistencia a la penetrabilidad (3 medidas·parcela<sup>-1</sup>) en todas las parcelas del ensayo.

### **D.1. Resultados**

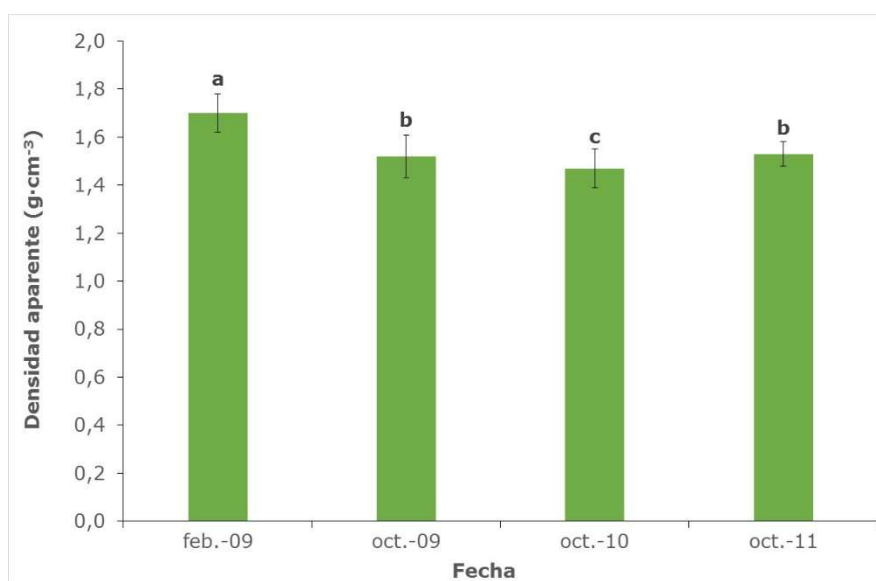
#### **I. Densidad aparente**

El valor medio de la densidad aparente  $\pm$  desviación estándar (n=80) fue igual a  $1,53 \pm 0,05 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  y el rango de densidad varió entre 1,62 y 1,40  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$

3. El test de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $H=8,92$ ;  $p=0,444$ ).

En la Figura 3.17 se representa la evolución de la densidad aparente media evaluada en las parcelas sometidas a diferentes tratamientos en las cuatro campañas del ensayo de campo.

El análisis estadístico de la densidad aparente para el factor fecha mediante el test de Kruskal Wallis mostró que la densidad aparente disminuyó de forma significativa ( $H=55,40$ ;  $p=0,00$ ) por la aplicación reiterada de tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización durante cuatro campañas consecutivas. El test de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher agrupó las fechas en tres grupos homogéneos, como puede observarse en la Figura 3.17. La densidad media máxima se registró al inicio del ensayo (febrero 2009) y la densidad media mínima se alcanzó en octubre de 2010.



**Figura 3.17.** Evolución de la densidad aparente (promedio  $\pm$  desviación estándar) medida *in situ* en las parcelas del ensayo en diferentes fechas. Las barras seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo al test LSD de Fisher ( $P>0,05$ ).

## II. Resistencia a la penetrabilidad

La Tabla 3.12 recoge el análisis de la varianza a dos vías (tratamiento y profundidad) de la resistencia a la penetrabilidad en la última campaña. En esta tabla puede observarse que fue significativo ( $P < 0,05$ ) el efecto de la profundidad, el tratamiento y la interacción de ambas variables. Por tanto, para la variable resistencia a la penetrabilidad el efecto de la profundidad fue diferente según el tratamiento aplicado.

**Tabla 3.12.** Efecto de la profundidad (P), del tratamiento (T) y la interacción profundidad x tratamiento (PxT) en la resistencia a la penetrabilidad en la Campaña 2011-2012. ANOVA con dos factores fijos.

Fuente	SC	gl	CM	F	P
Profundidad (P)	18.074.010	1	18.074.010	296,40	0
Tratamiento (T)	2.929.698	9	325.522	5,34	0
PxT	2.909.006	9	323.223	5,30	0
Residuos	33.050.318	542	60.978		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad.

Un segundo análisis de varianza sin interacción corroboró que la resistencia a la penetrabilidad mostró diferencias significativas entre las profundidades ( $F=276,95$ ;  $P < 0,05$ ) y entre los tratamientos ( $F=4,99$ ;  $P < 0,05$ ).

A continuación, el programa estadístico realizó un análisis de regresión lineal simple para cada tratamiento con el objeto de establecer la relación entre la resistencia a la penetrabilidad y la profundidad. En la Tabla 3.13 se indican los tratamientos aplicados, las ecuaciones de los modelos de la resistencia obtenidos por regresión lineal, el estadístico de contraste (F) y p-valor, además del coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

**Tabla 3.13.** Ecuaciones obtenidas por regresión lineal para estimar la resistencia a la penetrabilidad (R.P.) en función de la profundidad, para cada uno de los tratamientos estudiados en la Campaña 2011-2012. Parámetros estadísticos para la interpretación de la bondad del ajuste de los datos.

Tratamiento	Ecuación	F	P	R <sup>2</sup>
Testigo	R.P. = 192,72 + 18,31·prof.	13,99	0	0,2294
Testigo + P	R.P. = 61,71 + 15,02·prof.	48,09	0	0,3907
Testigo + TC1 + P	R.P. = -135,45 + 42,78·prof.	89,48	0	0,6556
Testigo + TC2 + P	R.P. = 103,72 + 15,29·prof.	32,47	0	0,3474
<i>B. nigra</i> + P	R.P. = -116,22 + 35,50·prof.	87,70	0	0,6189
<i>B. nigra</i> + TC1 + P	R.P. = 120,80 + 16,25·prof.	15,59	0	0,2377
<i>B. nigra</i> + TC2 + P	R.P. = 55,80 + 31,31·prof.	51,48	0	0,5336
<i>S. alba</i> + P	R.P. = 51,71 + 21,48·prof.	26,64	0	0,3550
<i>S. alba</i> + TC1 + P	R.P. = 144,48 + 16,40·prof.	26,64	0	0,3303
<i>S. alba</i> + TC2 + P	R.P. = 53,74 + 18,85·prof.	30,22	0	0,3387

TC1: Torta de colza, a razón de 7.000 kg·ha<sup>-1</sup>. TC2: Torta de colza, a razón de 14.000 kg·ha<sup>-1</sup>. R.P.: resistencia a la penetrabilidad (N·cm<sup>-2</sup>). Prof.: profundidad. **F**: F-Fisher. **P**: probabilidad. **R<sup>2</sup>**: coeficiente de determinación.

En todos los tratamientos la profundidad influyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en la resistencia, de modo que, a mayor profundidad mayor la resistencia a la penetrabilidad. Las ecuaciones obtenidas mediante regresión lineal fueron válidas ( $P < 0,05$ ) para modelizar los datos de la resistencia a la penetrabilidad. No obstante, hay ecuaciones que permiten estimar de forma más precisa la resistencia que otras ya que los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) variaron entre 0,2294 (Testigo) y 0,6556 (Testigo + TC1 + P).

La resistencia de la penetrabilidad del Testigo difirió significativamente ( $P < 0,05$ ) de la resistencia de los siguientes tratamientos: Testigo + TC1 + P, *B. nigra* + P y *B. nigra* + TC2 + P.

De la observación directa de los datos se determinó que el nivel crítico de 2 MPa para la resistencia a la penetrabilidad se superó a 10 cm.



## D.2. Discusión

La densidad aparente media para esta campaña fue ligeramente superior a la de la campaña anterior. Al igual que en el resto de las campañas, la densidad aparente no mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

La aplicación reiterada de tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización en rotación con los cultivos de pimiento, la adición de compost y la incorporación de los restos de vegetales de pimiento han reducido la densidad aparente del suelo durante los 4 años de estudio. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores. Mujdeci *et al.* (2017) estudiaron en condiciones de campo el efecto de diferentes tratamientos (estiércol, abono verde y labrado convencional) en las propiedades físicas del suelo. La incorporación de estiércol y abono verde redujeron la densidad aparente, destacando el estiércol que la redujo en mayor medida. Núñez-Zofío *et al.* (2012) observaron reducciones de la densidad aparente a diferentes profundidades (0-10 cm, 10-20 cm y 20-30 cm) con los tratamientos de biosolarización: mezcla no-compostada de estiércol de oveja y gallinaza y mezcla semicompostada de estiércol de caballo y gallinaza. Fernández *et al.* (2004) determinaron la densidad aparente a 3 profundidades (0-10 cm, 10-20 cm y 20-30 cm) en un invernadero en el que se aplicaron diferentes tratamientos de biosolarización. Los resultados mostraron un descenso de la densidad aparente en los primeros 10 cm del suelo en el tratamiento de biosolarización con estiércol de ovino y gallinaza. Mbagwn (1992) obtuvo reducciones de la densidad aparente con aportaciones de materiales orgánicos urbanos, hecho atribuible a la baja densidad de estos productos y a su tendencia a aumentar el espacio poroso, tal y como describen en sus trabajos: Letey (1985), Novoa *et al.* (1991) y Kay *et al.* (1997). En general, la mezcla de suelo con materiales orgánicos menos densos como estiércoles, resulta en un descenso de la densidad aparente (Haynes y Naidu, 1998).

Con respecto a la resistencia a la penetrabilidad, a diferencia del resto de campañas, se observaron diferencias para el factor tratamiento y profundidad, además, su interacción fue significativa. Por consiguiente, el efecto de la

profundidad en la resistencia a la penetrabilidad fue diferente según el tratamiento aplicado. En general, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) (indicadores de la bondad del ajuste) de las ecuaciones de la resistencia a la penetrabilidad fueron bajos, consecuencia de la variabilidad de los datos.

La resistencia a la penetrabilidad del tratamiento Testigo fue significativamente diferente de la resistencia de los tratamientos Testigo + TC1 + P, *B. nigra* + P y *B. nigra* + TC2 + P. Estos tratamientos en los que se incorporó material biofumigante en verde y/o se les añadió torta de colza disminuyeron la resistencia a la penetrabilidad en esta campaña. Estos resultados concuerdan con los de Mujdeci *et al.* (2017) que aplicaron abonos verdes y estiércoles durante cuatro años consecutivos, reduciendo la resistencia a la penetrabilidad de 0-10 cm y de 10-20 cm. Estos autores indicaron que la incorporación de grandes cantidades de materia orgánica puede favorecer la formación de complejos arcillo-húmicos, que por una parte, reducen la resistencia a la penetrabilidad, y por otra parte, protegen la materia orgánica de la descomposición microbiana. Lee *et al.* (2010) evaluaron la mejora de las propiedades físicas del suelo por el uso de diferentes técnicas de manejo del suelo relativas a la labranza y la aplicación de paja de arroz y abonos verdes. En el primer año de estudio no observaron cambios en la resistencia a la penetrabilidad, mientras que en el segundo año, esta propiedad presentó valores inferiores por la incorporación de abonos verdes y paja de arroz.

En esta última campaña, el nivel crítico de 2 MPa para la resistencia a la penetrabilidad se superó a 10 cm, a menor profundidad que en el resto de las campañas. En parte estos resultados podrían explicarse por el bajo contenido de humedad del suelo en el momento de realizar las mediciones. Silva *et al.*, (2016) señalaron que el incremento de la humedad reduce la cohesión del suelo y las fuerzas de adhesión, y además, el agua tiene un efecto lubricante sobre la penetración del cono del penetrómetro. Cuando la humedad del suelo disminuye, se desarrollan potenciales de agua negativos y el agua sostenida por las partículas del suelo actúa como un agente de unión, aumentando así, la cohesión.

Constantini (1996) concluyó que la resistencia a la penetrabilidad estaba positivamente correlacionada con la densidad aparente y negativamente correlacionada con la humedad para todos los suelos estudiados. Para Silva *et al.* (2016) la densidad aparente y la humedad edáfica son atributos esenciales para explicar las variaciones de la resistencia a la penetrabilidad en campo

En este estudio de campo, en general, los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización no redujeron la resistencia a la penetrabilidad salvo tres tratamientos de biosolarización en la última campaña de estudio. La profundidad tuvo un efecto muy significativo en la resistencia a la penetrabilidad en todas las campañas, aumentando su influencia conforme avanzó el ensayo de campo. No obstante, además de la profundidad hay otros factores que afectaron a la resistencia a la penetrabilidad y cuyo efecto no fue cuantificado en el análisis, como la densidad aparente, el contenido de humedad del suelo, el contenido de materia orgánica, la heterogeneidad del suelo, las operaciones de labranza con maquinaria y la existencia de gravas.

### **3.6.2. Propiedades químicas del suelo**

#### **3.6.2.1. Material y métodos**

Las muestras de suelo fueron recogidas de forma aleatoria dentro de cada parcela elemental, cada muestra compuesta estaba formada por 10-15 submuestras. Se utilizó una barrena para extraer el suelo a una profundidad comprendida entre 5-20 cm. Los muestreos se realizaron al inicio del establecimiento del ensayo y después de finalizar los tratamientos, en el mes de mayo de cada campaña. Los parámetros químicos fueron determinados en el Laboratorio Agroalimentario Oficial de Extremadura, de acuerdo a los métodos estándares de análisis de suelo (MAPA, 1994) y fueron los siguientes: materia orgánica oxidable, conductividad eléctrica, pH, nitrógeno total, fósforo asimilable, potasio, magnesio, calcio, sodio, sulfatos y carbonatos.

### **3.6.2.2. Análisis de los datos**

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis multivariante de la varianza (MANOVA). Este análisis es una extensión del análisis de la varianza (ANOVA) en donde se consideran dos o más variables dependientes simultáneamente. El MANOVA es una técnica que permite estimar las diferencias entre las medias de varias categorías o tratamientos, mediante la comparación conjunta de las variables dependientes observadas (Avendaño Prieto *et al.*, 2014).

Cuando el resultado del test de MANOVA fue significativo ( $P < 0,05$ ), a continuación, se realizaron ANOVAs univariantes para estudiar la importancia de las variables dependientes. Y si el efecto de la variable era significativo ( $P < 0,05$ ), en último lugar, se hicieron comparaciones múltiples mediante el test de Tukey para ver en qué tratamientos se producían las diferencias significativas.

Los análisis se realizaron con el programa estadístico R (R Development Core Team) versión 3.5.1 (2018-07-02).

### **3.6.2.3. Campañas**

#### **A. Campaña 2008-2009**

##### **A.1. Resultados**

Los resultados del análisis de los parámetros químicos del suelo después de aplicar los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización en la primavera de 2009 se recogen en la Tabla 3.14. En esta se especifican los valores promedio de los parámetros para cada tratamiento (media  $\pm$  desviación típica,  $n=4$ ) y los valores promedio globales ( $n=40$ ).

Los parámetros químicos analizados en todas las parcelas de los tratamientos fueron los siguientes: materia orgánica oxidable, conductividad eléctrica, potasio, magnesio, nitrógeno total y calcio. El análisis estadístico mediante MANOVA no mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las

variables estudiadas para los tratamientos aplicados (Tabla 3.15). En definitiva, los datos relativos a los parámetros químicos son independientes del tratamiento aplicado.

Además de los parámetros especificados en la Tabla 3.14, en las parcelas del Bloque 2 se analizaron los siguientes: 1) carbonatos ( $\text{CO}_3^{-2}$ ) = < 1 %, n=10; 2) pH =  $6,14 \pm 0,16$  (promedio  $\pm$  desviación estándar, n=10; 3) sodio =  $0,248 \pm 0,09$  meq/100 g, n=10; 4) sulfatos ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) =  $162,14 \pm 148,73$  ppm, n=10.

Las muestras de suelos mostraron una variabilidad muy alta para el parámetro sulfatos, los tratamientos *B. oleracea* y Testigo presentaron los valores menores (< 20 ppm), mientras que el tratamiento *B. nigra* + P presentó el valor mayor (407,2 ppm). Con respecto al parámetro sodio, los tratamientos de *S. alba*, con y sin plástico, presentaron los valores más elevados.

**Tabla 3.14.** Valores medios  $\pm$  desviación típica de las propiedades químicas de suelo en los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización aplicados durante la Campaña 2008-2009.

Tratamientos	M.O. (%)	C.E. (dS m <sup>-1</sup> )	N tot (%)	Ca <sup>2+</sup> (meq/100g)	Mg <sup>2+</sup> (meq/100g)	K <sup>+</sup> (meq/100g)
<i>B. carinata</i>	0,71 $\pm$ 0,08	0,15 $\pm$ 0,10	0,04 $\pm$ 0,00	3,80 $\pm$ 0,37	1,56 $\pm$ 0,11	0,27 $\pm$ 0,03
<i>B. carinata</i> + P	0,69 $\pm$ 0,14	0,12 $\pm$ 0,09	0,03 $\pm$ 0,01	3,77 $\pm$ 0,38	1,51 $\pm$ 0,17	0,29 $\pm$ 0,03
<i>B. oleracea</i>	0,50 $\pm$ 0,14	0,10 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,01	3,91 $\pm$ 0,68	1,61 $\pm$ 0,22	0,23 $\pm$ 0,01
<i>B. oleracea</i> + P	0,59 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,07	0,03 $\pm$ 0,00	3,75 $\pm$ 0,45	1,51 $\pm$ 0,17	0,23 $\pm$ 0,03
<i>B. nigra</i>	0,62 $\pm$ 0,08	0,13 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,01	3,93 $\pm$ 0,54	1,59 $\pm$ 0,26	0,25 $\pm$ 0,03
<i>B. nigra</i> + P	0,53 $\pm$ 0,11	0,16 $\pm$ 0,10	0,04 $\pm$ 0,01	3,65 $\pm$ 0,68	1,46 $\pm$ 0,18	0,24 $\pm$ 0,04
<i>S. alba</i>	0,56 $\pm$ 0,24	0,17 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,00	4,10 $\pm$ 0,65	1,65 $\pm$ 0,23	0,26 $\pm$ 0,03
<i>S. alba</i> + P	0,76 $\pm$ 0,23	0,16 $\pm$ 0,12	0,05 $\pm$ 0,01	4,62 $\pm$ 0,79	1,85 $\pm$ 0,23	0,29 $\pm$ 0,06
Testigo	0,67 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,07	0,04 $\pm$ 0,00	4,40 $\pm$ 0,75	1,81 $\pm$ 0,30	0,25 $\pm$ 0,04
Testigo + P	0,50 $\pm$ 0,14	0,07 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,01	3,56 $\pm$ 0,12	1,44 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,04
MEDIA	0,61 $\pm$ 0,16	0,13 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,01	3,95 $\pm$ 0,59	1,60 $\pm$ 0,22	0,25 $\pm$ 0,04

M.O.: Materia Orgánica oxidable; C.E.: Conductividad Eléctrica; N tot: Nitrógeno total; Ca<sup>2+</sup>: Calcio; Mg<sup>2+</sup>: Magnesio; K<sup>+</sup>: Potasio.

**Tabla 3.15.** Efecto de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización en las propiedades químicas del suelo en la Campaña 2008-2009. Análisis multivariante de la varianza (MANOVA).

Fuente	gl	Pillai	F	gl num.	gl den.	P
Tratamiento (T)	9	1,599	1,212	54	180	0,177
Residuos	30					

**gl:** grados de libertad. **Pillai:** Traza de Pillai. **F:** F-Fisher. **gl num.:** grados de libertad para el numerador. **gl den.:** grados de libertad para el denominador. **P:** probabilidad

## B. Campaña 2009-2010

### B.1. Resultados

En la Tabla 3.16 se recogen los datos relativos al análisis de los parámetros químicos del suelo estudiados después de aplicar los tratamientos en la primavera de 2010. Los parámetros químicos analizados en todas las parcelas fueron los siguientes: materia orgánica oxidable, conductividad eléctrica, pH, nitrógeno total, fósforo asimilable, calcio y potasio. En la Tabla 3.16 se recogen los valores promedio de los parámetros estudiados ( $\pm$  desviación típica,  $n=4$ ) por tratamiento y el valor promedio global ( $n=24$ ).

Al igual que en la campaña anterior, el análisis simultáneo de todas las propiedades químicas del suelo mediante MANOVA no mostró diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre las propiedades para los tratamientos aplicados. En la Tabla 3.17 se recoge el análisis MANOVA para esta campaña.

Al igual que en la Campaña 2008-2009, se estudiaron otros parámetros físico-químicos del suelo en el Bloque 2 del ensayo: 1) carbonatos =  $< 1\%$ ,  $n=10$ ; 2) sulfatos =  $20,63 \pm 16,35$  ppm,  $n=10$ ; 3) sodio =  $0,16 \pm 0,02$  meq/100 g,  $n=10$ .

El parámetro sulfatos presentó valores muy variables, el rango varió entre 0,5 ppm (*B. nigra* + P) y 56,14 ppm (*S. alba* + P). En relación al parámetro sodio, los valores de los tratamientos fueron homogéneos, siendo el tratamiento *S. alba* el que presentó el valor más elevado (0,194 meq/100 g) y el tratamiento Testigo + P (0,132 meq/100 g) el que presentó el valor más pequeño.

**Tabla 3.16.** Valores medios  $\pm$  desviación típica de las propiedades químicas de suelo en los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización aplicados durante la Campaña 2009-2010.

Tratamientos	M.O. (%)	C.E. (dS m <sup>-1</sup> )	pH	N tot (%)	P <sub>asim</sub> (ppm)	Ca <sup>2+</sup> (meq/100g)	K <sup>+</sup> (meq/100g)
<i>B. nigra</i>	0,96 $\pm$ 0,34	0,10 $\pm$ 0,03	6,88 $\pm$ 0,47	0,06 $\pm$ 0,02	131,36 $\pm$ 33,39	4,40 $\pm$ 1,00	0,27 $\pm$ 0,08
<i>B. nigra</i> + P	0,84 $\pm$ 0,23	0,10 $\pm$ 0,02	6,86 $\pm$ 0,30	0,06 $\pm$ 0,01	132,77 $\pm$ 31,16	4,25 $\pm$ 0,47	0,33 $\pm$ 0,08
<i>S. alba</i>	1,05 $\pm$ 0,40	0,11 $\pm$ 0,01	7,13 $\pm$ 0,38	0,07 $\pm$ 0,01	137,44 $\pm$ 15,12	4,47 $\pm$ 0,78	0,31 $\pm$ 0,02
<i>S. alba</i> + P	1,02 $\pm$ 0,10	0,14 $\pm$ 0,03	7,17 $\pm$ 0,20	0,09 $\pm$ 0,01	152,49 $\pm$ 14,53	5,08 $\pm$ 1,16	0,35 $\pm$ 0,06
Testigo	0,96 $\pm$ 0,42	0,10 $\pm$ 0,02	7,19 $\pm$ 0,28	0,07 $\pm$ 0,02	107,20 $\pm$ 19,70	4,58 $\pm$ 1,24	0,24 $\pm$ 0,04
Testigo + P	0,91 $\pm$ 0,25	0,09 $\pm$ 0,02 a	7,15 $\pm$ 0,27	0,07 $\pm$ 0,02	118,84 $\pm$ 30,20	4,02 $\pm$ 0,76	0,28 $\pm$ 0,11
MEDIA	0,96 $\pm$ 0,28	0,12 $\pm$ 0,03	7,06 $\pm$ 0,32	0,07 $\pm$ 0,02	129,00 $\pm$ 23,19	4,47 $\pm$ 0,90	0,30 $\pm$ 0,07

M.O.: Materia Orgánica oxidable; C.E.: Conductividad Eléctrica; N tot: Nitrógeno total; P<sub>asim</sub>: Fósforo asimilable; Ca<sup>2+</sup>: Calcio; K<sup>+</sup>: Potasio.

**Tabla 3.17.** Efecto de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización en las propiedades químicas del suelo en la Campaña 2009-2010. Análisis multivariante de la varianza (MANOVA).

Fuente	gl	Pillai	F	gl num.	gl den.	P
Tratamiento (T)	9	1,924	1,264	63	210	0,113
Residuos	30					

**gl:** grados de libertad. **Pillai:** Traza de Pillai. **F:** F-Fisher. **gl num.:** grados de libertad para el numerador. **gl den.:** grados de libertad para el denominador. **P:** probabilidad



## C. Campaña 2010-2011

### C.1. Resultados

En esta campaña a diferencia del resto, se hicieron análisis de las propiedades químicas en dos fechas: 1) después de la aplicación de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización (mayo de 2011); 2) después del cultivo de pimiento (octubre de 2011).

El análisis de los parámetros químicos estudiados en las muestras de suelo al finalizar los tratamientos en mayo de 2011 se recoge en la Tabla 3.18. En esta se expresan los valores medios  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ) de los parámetros por tratamientos, y además, los valores medios globales ( $n=30$ ) de los parámetros estudiados.

El análisis estadístico de las propiedades químicas del suelo mediante MANOVA no mostró diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre las variables estudiadas para los tratamientos aplicados en las muestras analizadas en mayo de 2011 (Tabla 3.19).

Además de los parámetros especificados en la Tabla 3.18, se analizaron otros parámetros en las muestras de suelo del Bloque 2: 1) carbonatos =  $< 1 \%$ ,  $n=10$ ; 2) sodio =  $0,220 \pm 0,04$  meq/100 g,  $n=10$ ; 3) sulfatos =  $< 0,5$  ppm,  $n=10$ .

En esta campaña los valores de sulfatos fueron inferiores a los de otras campañas, menores a  $0,5$  ppm. El parámetro sodio mostró una mayor variabilidad, y el rango estuvo comprendido entre  $0,15$  meq/100 g (*B. nigra* + P) y  $0,29$  meq/100 g (*S. alba* + P).

En la Tabla 3.20 se recogen los valores medios de los parámetros químicos analizados en las muestras de suelo recogidas al finalizar el cultivo de pimiento, en octubre de 2011.

Al igual que en la fecha anterior, el análisis simultáneo de todas las propiedades químicas del suelo mediante MANOVA no mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variables después del cultivo de pimiento (Tabla 3.21). El cultivo de pimiento no alteró las propiedades del suelo.

Como en la fecha anterior, se analizaron otros parámetros: 1) carbonatos =  $< 1 \%$ ,  $n=10$ ; 2) sodio =  $0,275 \pm 0,03$  meq/100 g,  $n=10$ ; 3) sulfatos =  $74,21 \pm 18,28$  ppm,  $n=10$ .

Con respecto al parámetro sodio, el valor máximo fue  $0,33$  meq/100 g en el tratamiento *S. alba* + P y el valor mínimo fue  $0,22$  meq/100 g en *B. nigra* + TC1 + P. Los datos relativos a los sulfatos mostraron una elevada variabilidad, estando comprendidos entre  $47,35$  ppm (*S. alba* + TC1 + P) y  $103,75$  ppm (*B. nigra* + TC1 + P).

**Tabla 3.18.** Valores medios  $\pm$  desviación típica de las propiedades químicas de suelo en los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización aplicados durante la Campaña 2010-2011 (mayo 2011).

Tratamientos	M.O. (%)	C.E. (dS m <sup>-1</sup> )	pH	N tot (%)	P <sub>asim</sub> (ppm)	Ca <sup>2+</sup> (meq/100g)	Mg <sup>2+</sup> (meq/100g)	K <sup>+</sup> (meq/100g)
<i>B. nigra</i> + P	0,67 $\pm$ 0,27	0,16 $\pm$ 0,03	6,82 $\pm$ 0,32	0,06 $\pm$ 0,01	119,30 $\pm$ 21,84	4,85 $\pm$ 0,64	1,97 $\pm$ 0,25	0,30 $\pm$ 0,06
<i>B. nigra</i> + TC1 + P	0,74 $\pm$ 0,14	0,29 $\pm$ 0,07	6,09 $\pm$ 0,34	0,07 $\pm$ 0,01	109,80 $\pm$ 4,71	4,54 $\pm$ 0,10	2,04 $\pm$ 0,06	0,34 $\pm$ 0,05
<i>B. nigra</i> + TC2 + P	0,73 $\pm$ 0,22	0,33 $\pm$ 0,05	6,41 $\pm$ 0,82	0,07 $\pm$ 0,02	112,90 $\pm$ 20,62	4,52 $\pm$ 0,06	2,15 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,16
<i>S. alba</i> + P	0,67 $\pm$ 0,20	0,14 $\pm$ 0,04	6,75 $\pm$ 0,25	0,06 $\pm$ 0,01	119,40 $\pm$ 19,21	4,96 $\pm$ 0,58	2,02 $\pm$ 0,28	0,30 $\pm$ 0,07
<i>S. alba</i> + TC1 + P	0,73 $\pm$ 0,39	0,27 $\pm$ 0,04	6,01 $\pm$ 0,31	0,07 $\pm$ 0,01	109,10 $\pm$ 19,69	4,46 $\pm$ 0,45	2,01 $\pm$ 0,20	0,34 $\pm$ 0,05
<i>S. alba</i> + TC2 + P	1,03 $\pm$ 0,23	0,37 $\pm$ 0,04	5,91 $\pm$ 0,28	0,10 $\pm$ 0,02	132,03 $\pm$ 28,72	5,38 $\pm$ 1,03	2,47 $\pm$ 0,51	0,48 $\pm$ 0,03
Testigo	0,69 $\pm$ 0,18	0,13 $\pm$ 0,03	6,57 $\pm$ 0,13	0,06 $\pm$ 0,02	115,40 $\pm$ 7,02	4,74 $\pm$ 1,07	2,00 $\pm$ 0,42	0,27 $\pm$ 0,07
Testigo + P	0,73 $\pm$ 0,30	0,14 $\pm$ 0,02	6,98 $\pm$ 0,08	0,06 $\pm$ 0,01	101,10 $\pm$ 16,90	4,80 $\pm$ 0,86	1,41 $\pm$ 1,07	0,25 $\pm$ 0,05
Testigo + TC1 + P	0,64 $\pm$ 0,15	0,32 $\pm$ 0,07	5,91 $\pm$ 0,25	0,07 $\pm$ 0,01	117,60 $\pm$ 21,37	4,73 $\pm$ 0,34	2,11 $\pm$ 0,11	0,30 $\pm$ 0,09
Testigo + TC2 + P	0,97 $\pm$ 0,33	0,34 $\pm$ 0,05	6,31 $\pm$ 0,86	0,09 $\pm$ 0,01	110,10 $\pm$ 17,10	5,25 $\pm$ 1,25	2,46 $\pm$ 0,44	0,39 $\pm$ 0,04
MEDIA	0,76 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,10	6,38 $\pm$ 0,53	0,07 $\pm$ 0,02	114,67 $\pm$ 17,65	4,82 $\pm$ 0,68	2,06 $\pm$ 0,47	0,35 $\pm$ 0,10

M.O.: Materia Orgánica oxidable; C.E.: Conductividad Eléctrica; N tot: Nitrógeno total; P<sub>asim</sub>: Fósforo asimilable; Ca<sup>2+</sup>: Calcio; Mg<sup>2+</sup>: Magnesio; K<sup>+</sup>: Potasio.

TC1: Torta de colza, a razón de 7.000 kg·ha<sup>-1</sup>. TC2: Torta de colza, a razón de 14.000 kg·ha<sup>-1</sup>.

**Tabla 3.19.** Efecto de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización en las propiedades químicas del suelo en la Campaña 2010-2011 (mayo 2011). Análisis multivariante de la varianza (MANOVA).

Fuente	gl	Pillai	F	gl num.	gl den.	P
Tratamiento (T)	9	2,826	1,214	72	160	0,159
Residuos	20					

**gl:** grados de libertad. **Pillai:** Traza de Pillai. **F:** F-Fisher. **gl num.:** grados de libertad para el numerador. **gl den.:** grados de libertad para el denominador. **P:** probabilidad

**Tabla 3.20.** Análisis de los parámetros químicos del suelo (media  $\pm$  desviación estándar (n = 4) en octubre de 2011, al finalizar el cultivo de pimiento en la Campaña 2010-2011.

Tratamientos	M.O. (%)	C.E. (dS m <sup>-1</sup> )	N tot (%)	pH	P <sub>asim</sub> (ppm)	Ca <sup>2+</sup> (meq/100g)	Mg <sup>2+</sup> (meq/100g)	K <sup>+</sup> (meq/100g)
<i>B. nigra</i> + P	0,57 $\pm$ 0,32	0,20 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	7,00 $\pm$ 0,05	107,32 $\pm$ 12,27	4,74 $\pm$ 1,24	2,15 $\pm$ 0,50	0,30 $\pm$ 0,06
<i>B. nigra</i> + TC1 + P	0,62 $\pm$ 0,46	0,22 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,01	7,05 $\pm$ 0,15	98,12 $\pm$ 8,83	4,39 $\pm$ 0,84	2,09 $\pm$ 0,44	0,32 $\pm$ 0,07
<i>B. nigra</i> + TC2 + P	1,01 $\pm$ 0,81	0,27 $\pm$ 0,08	0,07 $\pm$ 0,01	6,71 $\pm$ 0,15	100,66 $\pm$ 4,02	4,38 $\pm$ 0,75	2,08 $\pm$ 0,38	0,36 $\pm$ 0,16
<i>S. alba</i> + P	0,57 $\pm$ 0,31	0,23 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,01	6,98 $\pm$ 0,10	114,21 $\pm$ 7,11	5,28 $\pm$ 0,36	2,27 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,09
<i>S. alba</i> + TC1 + P	0,55 $\pm$ 0,39	0,24 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02	6,99 $\pm$ 0,53	98,50 $\pm$ 21,69	4,55 $\pm$ 1,23	2,14 $\pm$ 0,52	0,32 $\pm$ 0,09
<i>S. alba</i> + TC2 + P	0,74 $\pm$ 0,33	0,30 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	6,57 $\pm$ 0,19	125,53 $\pm$ 13,24	4,94 $\pm$ 0,76	2,32 $\pm$ 0,34	0,37 $\pm$ 0,08
Testigo	0,81 $\pm$ 0,48	0,21 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,02	6,88 $\pm$ 0,29	101,75 $\pm$ 23,97	4,89 $\pm$ 0,74	2,23 $\pm$ 0,30	0,28 $\pm$ 0,04
Testigo + P	0,49 $\pm$ 0,39	0,20 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,01	7,10 $\pm$ 0,05	85,10 $\pm$ 24,21	4,68 $\pm$ 1,20	2,14 $\pm$ 0,54	0,25 $\pm$ 0,09
Testigo + TC1 + P	0,67 $\pm$ 0,29	0,25 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,00	6,88 $\pm$ 0,20	105,01 $\pm$ 17,46	4,61 $\pm$ 0,53	2,18 $\pm$ 0,27	0,35 $\pm$ 0,06
Testigo + TC2 + P	0,85 $\pm$ 0,40	0,25 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,02	6,95 $\pm$ 0,18	109,43 $\pm$ 25,03	5,16 $\pm$ 1,19	2,28 $\pm$ 0,37	0,33 $\pm$ 0,03
MEDIA	0,69 $\pm$ 0,40	0,24 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,01	6,91 $\pm$ 0,25	104,56 $\pm$ 17,81	4,76 $\pm$ 0,83	2,19 $\pm$ 0,34	0,32 $\pm$ 0,08

M.O.: Materia orgánica oxidable; C.E.: Conductividad eléctrica; N. tot: Nitrógeno total; P<sub>asim</sub>: Fósforo asimilable; Ca<sup>2+</sup>: Calcio; Mg<sup>2+</sup>: Magnesio; K<sup>+</sup>: Potasio.

TC1: Torta de colza, a razón de 7.000 kg·ha<sup>-1</sup>. TC2: Torta de colza, a razón de 14.000 kg·ha<sup>-1</sup>

**Tabla 3.21.** Análisis multivariante de la varianza (MANOVA) de las muestras de suelo recogidas después del cultivo de pimiento en la Campaña 2010-2011 (octubre 2011).

Fuente	gl	Pillai	F	gl num.	gl den.	P
Tratamiento (T)	9	2,457	0,985	72	160	0,519
Residuos	20					

**gl**: grados de libertad. **Pillai**: Traza de Pillai. **F**: F-Fisher. **gl num.**: grados de libertad para el numerador. **gl den.**: grados de libertad para el denominador. **P**: probabilidad

## D. Campaña 2011-2012

### D.1. Resultados

Los valores medios  $\pm$  desviación estándar ( $n=4$ ) de los parámetros químicos del suelo correspondientes a los tratamientos evaluados en la Campaña 2011-2012 se recogen en la Tabla 3.22. El número de parámetros estudiados se redujo con respecto a otras campañas y fueron los siguientes: materia orgánica oxidable, conductividad eléctrica, pH, fósforo asimilable y sulfatos.

En esta última campaña, y a diferencia del resto de campañas, el análisis estadístico mediante MANOVA mostró diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre las propiedades químicas para los tratamientos aplicados, como puede observarse en la Tabla 3.23. La aplicación de diferentes tratamientos con distintos materiales biofumigantes ha supuesto la aparición de diferencias significativas entre las variables. A continuación, se realizaron análisis de la varianza a una vía (tratamiento) para cada una de las variables. Los resultados no mostraron diferencias significativas para dos variables: materia orgánica oxidable ( $F=1,51$ ;  $P>0,05$ ) y sulfatos ( $F=0,31$ ;  $P>0,05$ ). Por el contrario, el resto de variables si mostraron diferencias significativas entre los tratamientos: fósforo asimilable ( $F=4,21$ ;  $P<0,05$ ), pH ( $F=10,02$ ;  $P<0,05$ ) y conductividad eléctrica ( $F=2,25$ ;  $P<0,05$ ). Seguidamente, se hicieron comparaciones múltiples mediante el test de Tukey para identificar entre qué tratamientos se habían detectado diferencias significativas para el fósforo asimilable, el pH y la conductividad eléctrica. Para estos parámetros se diferenciaron varios grupos homogéneos de acuerdo al test de Tukey, como puede observarse en la Tabla 3.22. En relación a la conductividad eléctrica, las medias de los tratamientos se consideraron iguales al nivel de significación del 5 %. No obstante, para esta variable se observaron varios subgrupos homogéneos que se indican con colores en la Tabla 3.22. Los valores de la conductividad eléctrica fueron mayores en los tratamientos en los que añadió torta de colza, mientras que los tratamientos Testigo y Testigo + P presentaron los menores valores para la conductividad. En relación al pH, los tratamientos Testigo y Testigo + P presentaron los valores más elevados.

**Tabla 3.22.** Valores medios  $\pm$  desviación típica de las propiedades químicas de suelo en los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización aplicados durante la Campaña 2011-2012.

Tratamientos	M.O. (%)	C.E. (dS m <sup>-1</sup> )	pH	P <sub>asim</sub> (ppm)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)
MB + BioFence	0,86 $\pm$ 0,09	0,26 $\pm$ 0,13	6,36 $\pm$ 0,29 abc	142,75 $\pm$ 21,91 ab	163,08 $\pm$ 161,03
MB + BioFence + P	0,89 $\pm$ 0,17	0,20 $\pm$ 0,08	6,64 $\pm$ 0,55 cd	135,30 $\pm$ 4,84 a	238,28 $\pm$ 149,38
MB + TC	1,08 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,23	5,78 $\pm$ 0,16 ab	180,45 $\pm$ 11,66 b	341,95 $\pm$ 154,09
MB + TC + P	1,10 $\pm$ 0,14	0,39 $\pm$ 0,24	6,64 $\pm$ 0,52 cd	146,78 $\pm$ 18,10 ab	346,43 $\pm$ 221,02
Testigo	0,88 $\pm$ 0,18	0,13 $\pm$ 0,06	7,25 $\pm$ 0,10 d	118,93 $\pm$ 11,67 a	249,35 $\pm$ 164,65
Testigo + P	0,78 $\pm$ 0,20	0,18 $\pm$ 0,11	7,23 $\pm$ 0,10 d	112,88 $\pm$ 24,92 a	293,60 $\pm$ 370,61
Testigo + BioFence	0,91 $\pm$ 0,10	0,23 $\pm$ 0,12	6,60 $\pm$ 0,41 bcd	134,03 $\pm$ 19,27 a	292,50 $\pm$ 71,37
Testigo + BioFence + P	0,93 $\pm$ 0,25	0,27 $\pm$ 0,14	6,50 $\pm$ 0,40 bcd	122,78 $\pm$ 24,95 a	306,98 $\pm$ 116,10
Testigo + TC	0,96 $\pm$ 0,24	0,45 $\pm$ 0,22	5,62 $\pm$ 0,36 a	141,48 $\pm$ 18,99 ab	282,38 $\pm$ 101,46
Testigo + TC + P	1,07 $\pm$ 0,18	0,43 $\pm$ 0,29	6,04 $\pm$ 0,18 abc	137,88 $\pm$ 15,75 ab	263,75 $\pm$ 230,00
MEDIA	0,94 $\pm$ 0,18	0,31 $\pm$ 0,20	6,46 $\pm$ 0,61	137,29 $\pm$ 24,07	277,83 $\pm$ 175,76

M.O.: Materia Orgánica oxidable; C.E.: Conductividad Eléctrica; P<sub>asim</sub>: Fósforo asimilable; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: Sulfatos; MB: Mezcla Biofumigante; TC: Torta de Colza (14.000 kg·ha<sup>-1</sup>), BioFence®: pellets de *B. carinata* (3.000 kg·ha<sup>-1</sup>)

Para las variables fósforo asimilable y pH, los tratamientos seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente (P>0,05) de acuerdo al test de Tukey.

Para la variable conductividad eléctrica, los tratamientos con el mismo color pertenecen al mismo subgrupo homogéneo.

**Tabla 3.23.** Efecto de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización en las propiedades químicas del suelo en la Campaña 2011-2012. Análisis multivariante de la varianza (MANOVA).

Fuente	gl	Pillai	F	gl num.	gl den.	P
Tratamiento (T)	9	1,624	1,603	45	150	0,018
Residuos	30					

**gl**: grados de libertad. **Pillai**: Traza de Pillai. **F**: F-Fisher. **gl num.**: grados de libertad para el numerador. **gl den.**: grados de libertad para el denominador. **P**: probabilidad

## E. Evolución de los parámetros

Conforme a los resultados, los tratamientos aplicados no tuvieron efecto significativo en las propiedades químicas del suelo para cada una de las tres primeras campañas del estudio. Solamente en la cuarta campaña algunos parámetros presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Este hecho no quiere decir que los parámetros químicos no hayan sufrido cambios a lo largo del estudio.

La aplicación reiterada de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización modificaron todos parámetros químicos del suelo objeto de estudio, a excepción del parámetro carbonatos, que se mantuvo invariable durante las cuatro campañas.

El ANOVA a una vía (fecha) para cada uno de los parámetros químicos estudiados se recoge en la Tabla 3.24. Cabe destacar que todos los parámetros químicos mostraron diferencias significativas entre las fechas estudiadas. A continuación, para cada parámetro se realizaron comparaciones múltiples mediante el test de Tukey, agrupándose las fechas en varios grupos homogéneos como puede observarse en las Figuras 3.18, 3.19, 3.20 y 3.21. En estas se representan las evoluciones de los parámetros químicos del suelo a lo largo del ensayo de campo mediante gráficos de barras. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  error estándar de los parámetros en cada una de las fechas estudiadas. Las fechas seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey.

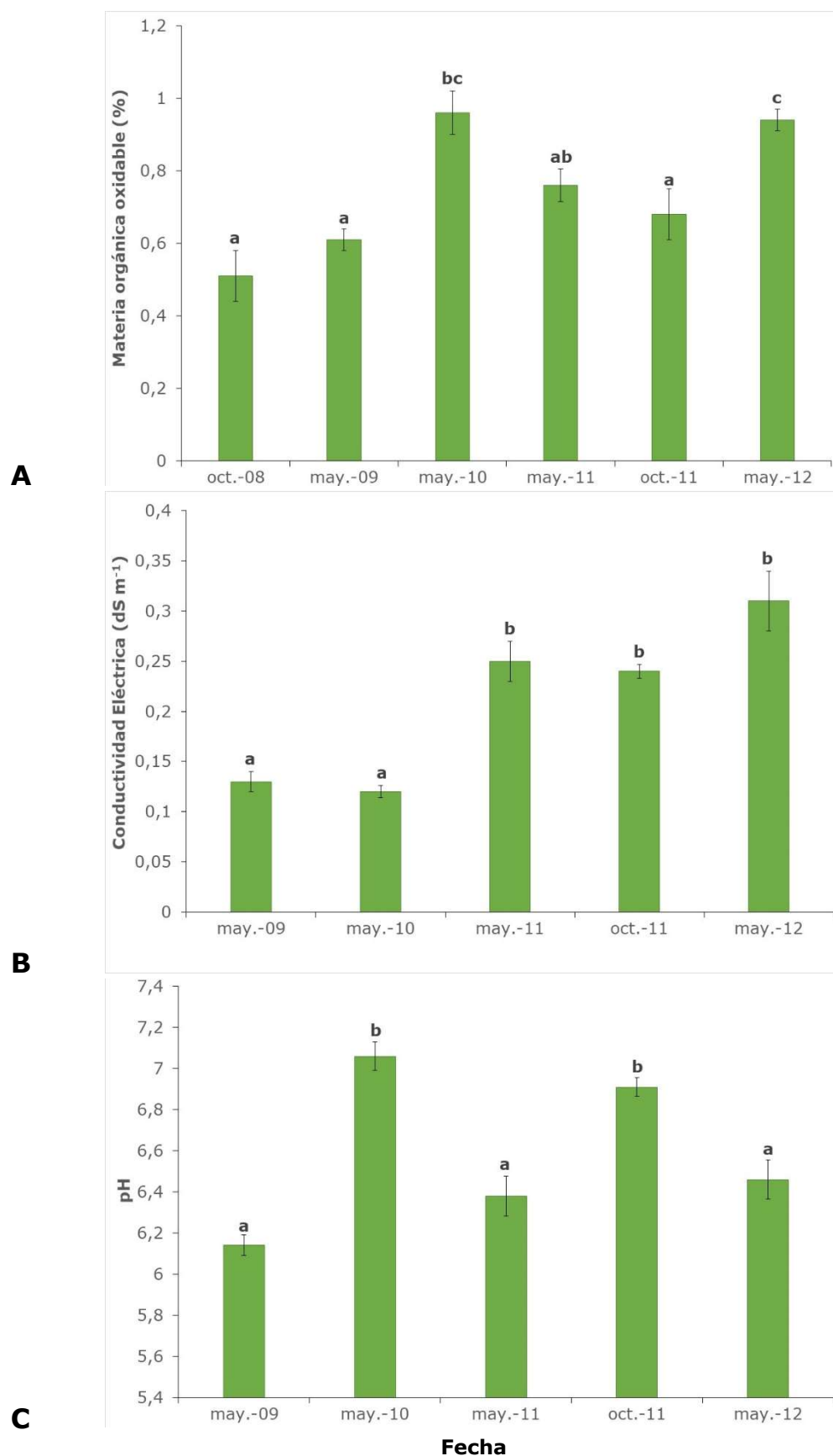
**Tabla 3.24.** Efecto de la fecha en las propiedades químicas del suelo. ANOVAs con 1 factor fijo.

Parámetro	Fuente	SC	gl	CM	F	P
Materia orgánica oxidable	Fecha	3,43	5	0,69	10,56	0,00
	Residuos	10,47	161	0,07		
Conductividad eléctrica	Fecha	0,88	4	0,22	16,12	0,00
	Residuos	2,16	158	0,01		
pH	Fecha	12,37	4	3,09	14,95	0,00
	Residuos	26,68	129	0,21		
Nitrógeno total	Fecha	0,03	3	0,01	45,3	0,00
	Residuos	0,02	120	0,00		
Fósforo asimilable	Fecha	39.452	4	9.863	20,41	0,00
	Residuos	58.958	122	483		
Potasio	Fecha	0,27	4	0,07	12,91	0,00
	Residuos	0,64	122	0,01		
Magnesio	Fecha	6,93	2	3,47	29,07	0,00
	Residuos	11,56	97	0,12		
Calcio	Fecha	17,03	3	5,68	10,43	0,00
	Residuos	65,30	120	0,54		
Sodio	Fecha	0,05	3	0,02	5,71	0,03
	Residuos	0,10	32	0,00		
Sulfatos	Fecha	$1,03 \cdot 10^4$	4	$2,57 \cdot 10^5$	13,30	0,00
	Residuos	$1,37 \cdot 10^4$	71	$1,93 \cdot 10^4$		

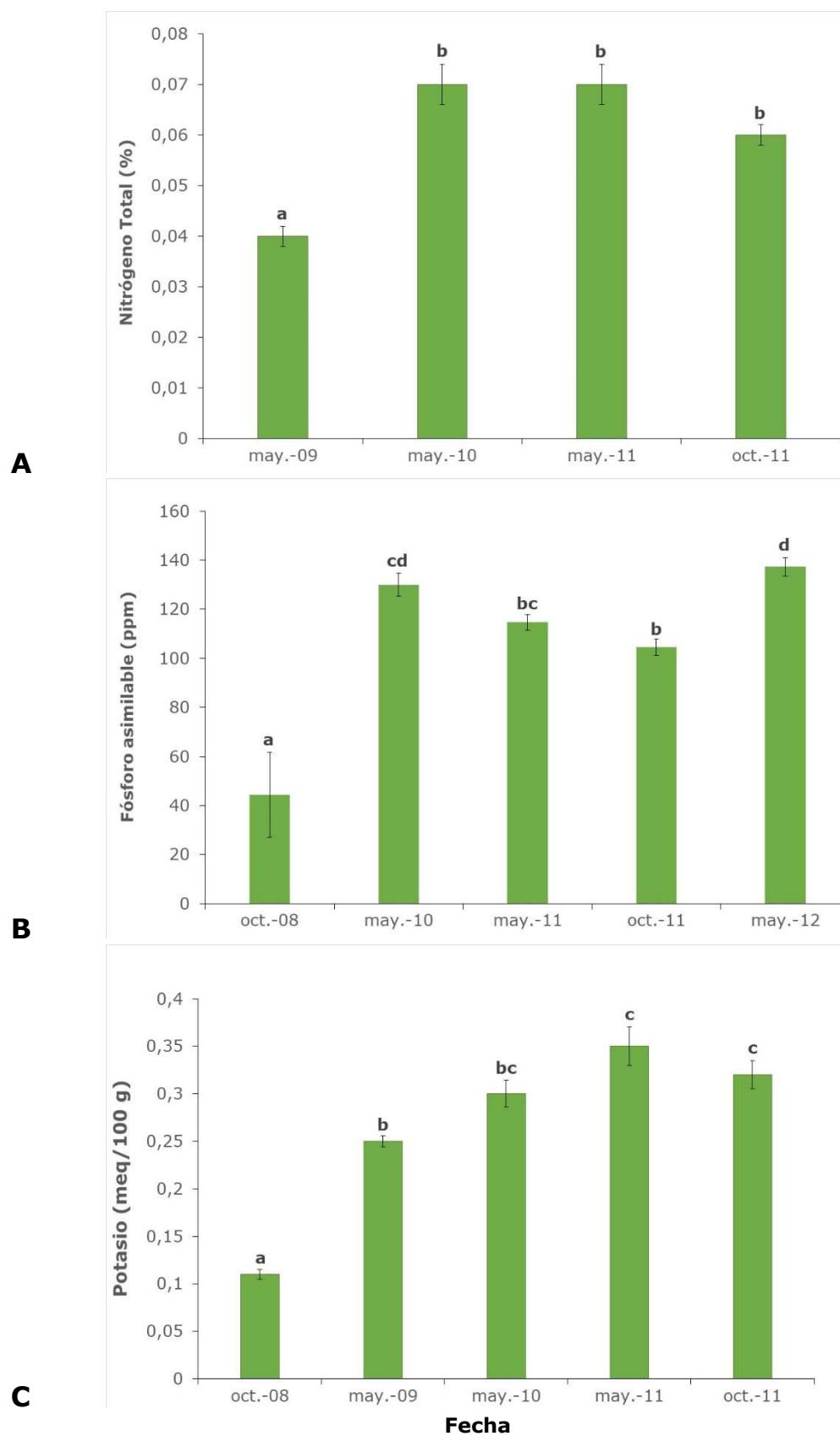
**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad

En las Figuras 3.18, 3.19, 3.20 y 3.21 se puede observar que la aplicación reiterada de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización incrementó el valor de todos los parámetros químicos, a excepción del pH. Este experimentó cambios significativos entre fechas, y sus valores fueron alternándose entre dos grupos homogéneos (Figura 3.18.C). Además, de todos los parámetros químicos estudiados, solamente el pH mostró diferencias significativas entre antes y después del cultivo de pimiento en la Campaña 2010-2011.

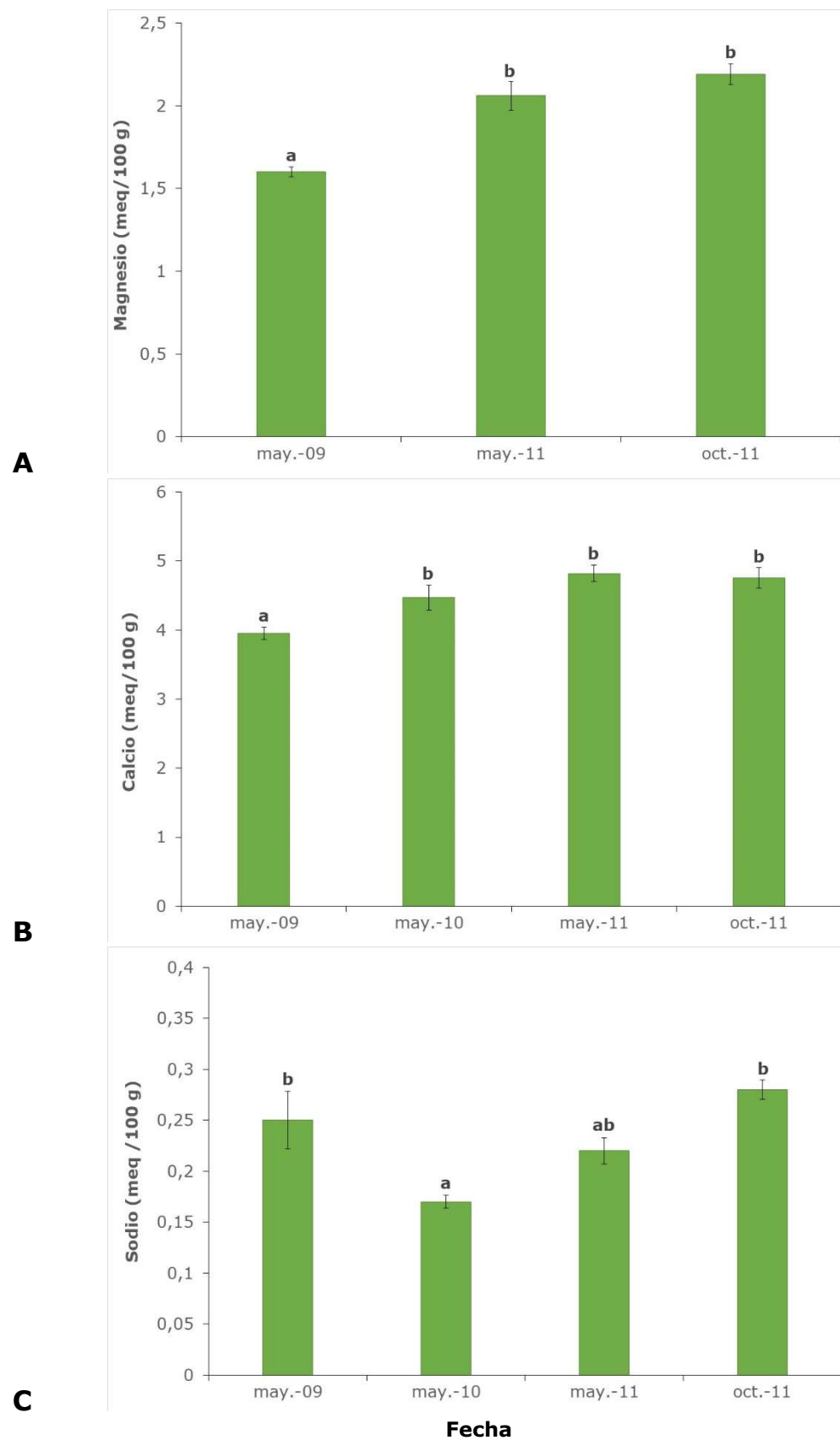




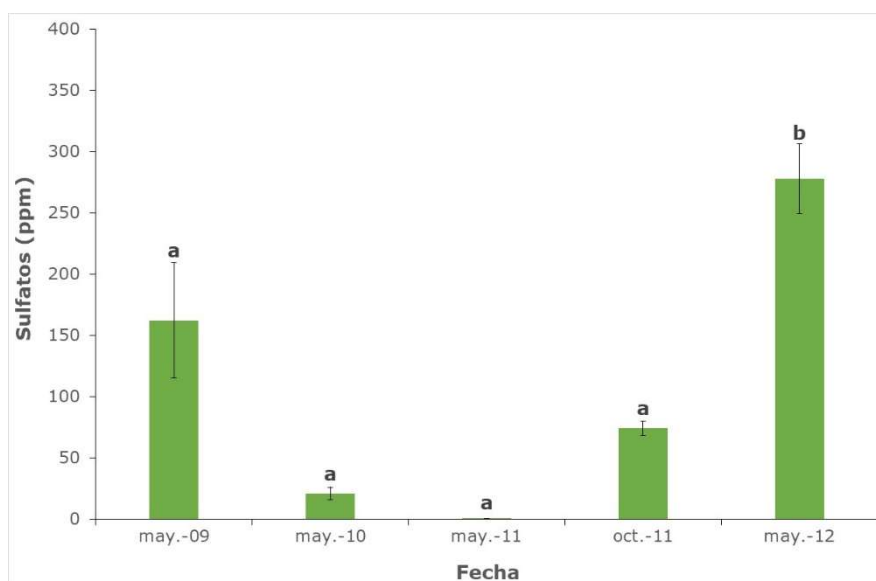
**Figura 3.18.** Evolución de la materia orgánica oxidable(**A**), conductividad eléctrica (**B**) y pH (**C**) en el ensayo de campo. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  error estándar, estas seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey.



**Figura 3.19.** Evolución del nitrógeno total (**A**), fósforo asimilable (**B**) y potasio (**C**). Las barras representan el valor promedio  $\pm$  error estándar, estas seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey.



**Figura 3.20.** Evolución del magnesio (A), calcio (B) y sodio (C). Las barras representan el valor promedio  $\pm$  error estándar y cuando están seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey.



**Figura 3.21.** Evolución del contenido de sulfatos (promedio  $\pm$  error estándar) en las muestras de suelo. Las barras seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey.

## F. Discusión

La aplicación de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización no tuvo efectos significativos en las propiedades químicas del suelo en las tres primeras campañas del ensayo. Solamente en la cuarta campaña, algunos tratamientos ocasionaron la aparición de diferencias significativas en estas propiedades químicas.

Se observó un incremento de todos los parámetros químicos a lo largo del ensayo de campo, a pesar de que no se observaron diferencias de los parámetros para cada una de las campañas.

En relación a la **materia orgánica oxidable**, de acuerdo a los niveles propuestos por Walkley (1935) y Black (1965), el contenido inicial sería muy bajo (inferior al 1%), ya que el suelo objeto de estudio está muy mineralizado. Por otro lado, Llera (2011) propuso otros valores más adecuados para las condiciones ambientales de Extremadura, teniendo en cuenta la textura del suelo y el tipo de explotación. A pesar de ser un índice más adecuado, el valor de la materia orgánica presentó valores inferiores al propuesto (1,5 %) para un suelo franco-arenoso y de regadío.

La reiteración de tratamientos de desinfección en rotación con el cultivo de pimiento, la aplicación de compost y restos de cosechas incrementaron el contenido de materia orgánica oxidable del suelo del ensayo. El valor de este parámetro fue significativamente diferente entre las fechas de estudio, y el contenido medio inicial de materia orgánica se incrementó un 45,7 %. Azimzadeh *et al.* (2016) observaron un incremento del 41 % de la materia orgánica por la aplicación de abonos verdes (alfalfa). Yang *et al.* (2016) analizaron un mayor contenido de carbono orgánico en las muestras de suelos tratadas con abonos verdes (colza, guisante y raigrás). De igual forma, Tüzel *et al.* (2013) cultivaron abonos verdes (veza, guisante y raigrás italiano) y consiguieron incrementar la materia orgánica. Núñez-Zofío *et al.* (2012) detectaron una mayor cantidad de materia orgánica cuando se aplicaron estiércoles frescos y semicompostados mientras que la aplicación reiterada de tratamientos de biodesinfección (biosolarización) con pellets de *B. carinata* y abono verde de *S. alba* no modificó el contenido de materia orgánica.

Durante el periodo de estudio, la **conductividad eléctrica** del suelo se incrementó de 0,13 a 0,31 dS·m<sup>-1</sup>, aproximadamente, el triple. A pesar del aumento de la conductividad, estos valores son bajos y su influencia es inapreciable en el desarrollo del cultivo, de acuerdo a los niveles de referencia de la salinidad según CE<sub>1/5</sub> (solución suelo/agua) (Llera, 2011).

El valor de la conductividad eléctrica del suelo aumentó por la aplicación de diferentes tratamientos, adición de fertilizantes inorgánicos y orgánicos durante las cuatro campañas del ensayo de campo. Los resultados de Azimzadeh *et al.* (2016) mostraron un incremento del 35 % de la conductividad eléctrica por la incorporación de abonos verdes. Este incremento se observó después del cultivo, probablemente, debido a los exudados de la raíz y a la liberación de nutrientes y otros elementos por la descomposición de los residuos vegetales. Potgieter (2012) observó un incremento significativo de la conductividad eléctrica, tanto en el tratamiento control como en los tratamientos abonados en verde con *B. napus*, asociando este aumento a la alta concentración de macronutrientes. Este mismo

argumento utilizó Mitidieri *et al.* (2009) para justificar el incremento de conductividad eléctrica en los tratamientos biofumigantes (estiércol/brócoli y colza/brócoli). Hati *et al.* (2006) reportaron un incremento de la conductividad eléctrica en un suelo abonado con fertilizantes inorgánicos y estiércol durante 28 años.

La conductividad eléctrica no mostró diferencias significativas entre los tratamientos para las tres primeras campañas de estudio. Sin embargo, si presentó diferencias significativas en la última campaña, los tratamientos que presentaron una mayor conductividad fueron aquellos en los que se añadió torta de colza. Asimismo, Muramoto *et al.* (2016) obtuvieron un incremento de la conductividad eléctrica en las parcelas enmendadas con harina de semilla de *B. juncea* y *S. alba*. Ok *et al.* (2011) incorporaron residuos de colza y atribuyeron el incremento de la conductividad eléctrica del suelo a la solubilización de los cationes y aniones presentes en los residuos, durante el proceso de mineralización.

Los valores medios de **pH** se alternaron entre valores ligeramente ácidos (6,1-6,5) y neutros (6,6-7,3), de acuerdo a los valores propuestos por Rioja Molina (2002). Los tratamientos aplicados durante las cuatro campañas del ensayo de campo modificaron el valor del pH. El pH medio inicial (6,14) se incrementó en 0,32 unidades, a pesar de que este parámetro es muy estable debido al efecto tampón de los suelos (Fernández *et al.*, 2004). Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio coinciden con los de Yang *et al.* (2016) que reportaron un aumento de pH al aplicar colza como abono verde, al igual que en el estudio de Li *et al.* (2017), en el cual aplicaron abonos verdes con especies de brásicas. Además, se observó un aumento global del pH en las muestras de suelo recogidas después del cultivo de pimiento en el año 2011. La aplicación de fertilizantes pudo ser la causa de este incremento.

En las tres primeras campañas, el pH no varió significativamente entre los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. No obstante, en la última campaña se observaron diferencias significativas de pH entre los

tratamientos. Los tratamientos testigo, con y sin plástico, presentaron los valores máximos de pH, como en el estudio realizado por Brar *et al.* (2015), mientras que los tratamientos con torta de colza presentaron los valores mínimos. Muramoto *et al.* (2016) observaron un descenso del pH al aplicar harina de semilla de mostaza. La adición de torta colza pudo incrementar la actividad microbiana del suelo, liberándose ácidos, responsables de la bajada de pH (Momma *et al.*, 2006; Muramoto *et al.*, 2016).

Los valores de **nitrógeno total** aumentaron de forma significativa con el transcurso del ensayo, siendo los valores iniciales y finales, 0,04 y 0,06 %, respectivamente. Estos valores se corresponden con niveles muy bajos y bajos de nitrógeno total (Llera, 2011).

La aplicación de fertilizantes inorgánicos y de materia orgánica ha incrementado el valor medio del nitrógeno total durante las cuatro campañas de estudio. No obstante, no se observaron diferencias significativas para este parámetro entre los tratamientos a pesar de que otros autores han señalado el incremento del nitrógeno total por la adición de torta de colza. De hecho, Kucke (1993) utilizó torta de colza como fertilizante en cultivos de trigo, cebada y remolacha azucarera, incrementando la absorción de nitrógeno y mejorando la cantidad y calidad de las cosechas. Wang *et al.* (2014), elevaron el contenido de nitrógeno total al aplicar tratamientos de biofumigación con torta de colza a razón de 0,4 % en peso. Y Mazzola *et al.* (2001) observaron un incremento de nitrógeno en el suelo y un elevado contenido de este elemento en las hojas de manzano cuando usaron harina de semilla de *B. napus*.

El contenido inicial de **fósforo asimilable** (44,42 ppm) se incrementó de forma significativa durante el ensayo de campo, mediante la adición de fertilizantes inorgánicos y la aplicación de tratamientos. Liu *et al.* (2017) observaron un incremento del fósforo asimilable en los tratamientos fertilizantes con enmiendas orgánicas (purín y paja).

Cabe destacar que los valores de fósforo asimilable fueron muy elevados, teniendo en cuenta los valores de referencia propuestos por Llera (2011). Li *et al.* (2017) obtuvieron valores de fósforo asimilable similares a los obtenidos en este estudio. No obstante, valores mayores para este parámetro se han encontrado en invernaderos de Alicante cuando se aplicaron tratamientos de biofumigación y biosolarización (Fernández *et al.*, 2004). Estos autores atribuyeron este incremento a la actividad enzimática. El aporte de fósforo procedente de la materia orgánica y los microorganismos intervienen en la formación de fosfatos orgánicos (actividad fosfatasa) de elevado peso molecular, que impiden que sean precipitados en forma de fosfato cálcico.

Las muestras de suelo no mostraron diferencias significativas de fósforo asimilable entre los tratamientos en las tres primeras campañas. Asimismo, el contenido del fósforo tampoco varió por el cultivo de pimiento en la Campaña 2010-2011. Sin embargo, las muestras recogidas en la última campaña mostraron diferentes contenidos de fósforo para los distintos tratamientos. El tratamiento mezcla biofumigante más torta de colza (MB + TC) presentó el valor medio máximo para este parámetro. Wang *et al.* (2014) observaron que el uso de torta de colza en tratamientos biofumigantes incrementó el valor del fósforo asimilable.

Los valores medios de **magnesio** variaron entre 1,60 y 2,19 meq/100 g que coinciden con los niveles normales en el suelo (Llera, 2011). Aunque este parámetro no mostró diferentes valores entre los tratamientos evaluados por campaña, el valor medio de magnesio se incrementó significativamente durante el estudio. Potgieter (2012) observó un aumento de magnesio al aplicar abonos verdes (colza) y lo atribuyó a la fertilización con abonos comerciales. Fernández *et al.* (2004) asociaron el incremento de magnesio a la adición de enmiendas orgánicas.

Los valores medios de **calcio** estuvieron comprendidos entre 3,95 y 4,82 meq/100g, que según Llera (2011) se corresponden con niveles bajos en el suelo. Durante el desarrollo del ensayo de campo el contenido de calcio se incrementó



de forma significativa por la aplicación de materiales orgánicos. En este sentido, Yang *et al.* (2016) incrementaron el valor de este parámetro por la aplicación de abonos verdes (raigrás, guisante y colza). Núñez-Zofío *et al.* (2012) observaron un incremento de calcio en los tratamientos de biosolarización con estiércoles frescos y semicompostados.

Con respecto al **potasio**, no hubo diferencias significativas de potasio entre los tratamientos para ninguna de las campañas. Su contenido aumentó de forma significativa de 0,11 a 0,32 meq/100 g durante el estudio de campo. De acuerdo a los niveles de referencia (Urbano, 1995), al inicio del ensayo el suelo tenía un contenido muy pobre en potasio, mientras que en la fecha final, el contenido de potasio fue medio. La aplicación de fertilizantes inorgánicos y las enmiendas orgánicas han contribuido a este incremento. Fernández *et al.* (2004) duplicaron la cantidad de potasio por el aporte de materia orgánica. El uso de abonos verdes incrementó la concentración de potasio en suelos con respecto al uso de fertilizantes sintéticos (Aulakh *et al.*, 2000; Bulluck *et al.* 2002).

El contenido de **sodio** presentó diferencias significativas entre las fechas estudiadas, pero cabe señalar que no se observaron diferencias significativas entre el valor medio inicial y final del contenido en sodio. Inicialmente el sodio presentó un valor de 0,25 meq/100 g, descendió en las dos siguientes campañas, y en el análisis final, aumentó hasta el valor de 0,28 meq/100 g. La aplicación de materiales biofumigantes pudieron incrementar los valores de sodio. Fernández *et al.* (2004) reportaron un aumento de sodio por la aplicación de enmiendas orgánicas (estiércol de ovino y gallinaza) con respecto al testigo. No obstante, Potgieter (2012) observó también un incremento de sodio en el suelo causado por el agua utilizada en el riego.

El parámetro **carbonatos** se mantuvo invariable durante el estudio, la adición de materia orgánica y fertilizantes inorgánicos no modificó el contenido de carbonatos en el suelo. De acuerdo a los niveles de referencia, los niveles de carbonatos fueron muy bajos (Llera, 2011). Estos tienen una acción positiva en

la estructura del suelo y sobre la actividad de los microorganismos (Andrades y Martínez, 2014).

En relación al parámetro de **sulfatos** fue el que presentó mayor variabilidad, el contenido medio varió entre 0,49 y 277 ppm, observándose un incremento a lo largo del estudio. La incorporación de las especies biofumigantes en verde, la torta de colza y BioFence® incrementaron el contenido de azufre orgánico en suelo, que mediante la actividad microbiana se transformó en sulfatos, aumentando así la concentración en suelo y el valor de la conductividad eléctrica.

### **3.6.3. Producción de pimiento**

#### **3.6.3.1. Material y métodos**

La aplicación de tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización puede tener efecto en el rendimiento de la producción de cultivos posteriores a éstos, por la mejora de las propiedades físicas y químicas del suelo. Por ello, en estos ensayos de campo se evaluó el efecto de los tratamientos aplicados en la producción de pimiento para pimentón (var. Jaranda).

Las medidas de producción de pimiento se realizaron en el mes de septiembre. Para ello se eligió una de las filas centrales donde se cortaron 8 plantas, a continuación, se separaron los pimientos rojos y verdes de la planta y se pesaron por separado. Posteriormente, se hicieron los cálculos para estimar la producción de pimiento por parcela. Además, se estimó la materia seca a partir de la desecación en estufa a 105 °C durante 48 horas de una muestra de 20 pimientos rojos.

Los datos de producción se expresaron en  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de pimiento rojo, pimiento rojo seco, pimiento verde y producción de pimiento total por tratamiento evaluado.

### 3.6.3.2. Análisis de los datos

Previo al análisis estadístico, los datos de producción fueron transformados mediante la expresión  $\log_{10}(x+1)$  (Guerrero, 2012) para cumplir los requisitos de normalidad y homocedasticidad. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de la varianza para un factor (tratamiento) y dos factores (tratamiento y fecha). Las medias fueron comparadas mediante el test de Tukey con un nivel del 95 % de confianza.

Los análisis se realizaron con el programa estadístico R (R Development Core Team) versión 3.5.1 (2018-07-02).

### 3.6.3.3. Campañas

#### A. Campaña 2008-2009

##### A.1. Resultados

En la Tabla 3.25 se recoge la producción media  $\pm$  desviación estándar ( $n=4$ ) de pimiento rojo, pimiento rojo seco, pimiento verde y producción total ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) de los tratamientos evaluados en la primera campaña.

**Tabla 3.25.** Producción media  $\pm$  desviación estándar ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) de pimiento rojo, pimiento rojo seco, pimiento verde y producción total de los tratamientos ensayados en la campaña 2008-2009.

Tratamientos	Pimiento rojo ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Pimiento rojo seco ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Pimiento verde ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Producción total ( $\text{kg ha}^{-1}$ )
<i>B. carinata</i>	37.380 $\pm$ 3.609	5.172 $\pm$ 581	4.500 $\pm$ 1.710	41.880 $\pm$ 4.107
<i>B. carinata</i> + P	32.070 $\pm$ 7.401	4.542 $\pm$ 739	3.210 $\pm$ 2.201	35.280 $\pm$ 9.025
<i>B. oleracea</i>	33.915 $\pm$ 3.049	5.126 $\pm$ 427	5.550 $\pm$ 1.999	39.465 $\pm$ 3.069
<i>B. oleracea</i> + P	39.240 $\pm$ 6.080	5.589 $\pm$ 1.004	4.395 $\pm$ 1.961	43.643 $\pm$ 7.961
<i>B. nigra</i>	32.445 $\pm$ 1.222	4.956 $\pm$ 552	4.185 $\pm$ 1.372	36.630 $\pm$ 1.737
<i>B. nigra</i> + P	35.895 $\pm$ 8.194	5.264 $\pm$ 1.375	4.320 $\pm$ 1.744	40.215 $\pm$ 8.632
<i>S. alba</i>	35.760 $\pm$ 5.026	5.249 $\pm$ 1.057	3.855 $\pm$ 1.009	39.615 $\pm$ 5.936
<i>S. alba</i> + P	35.985 $\pm$ 613	4.808 $\pm$ 681	4.455 $\pm$ 778	40.440 $\pm$ 802
Testigo	36.945 $\pm$ 8.703	5.482 $\pm$ 946	5.340 $\pm$ 1.655	42.285 $\pm$ 9.750
Testigo + P	38.280 $\pm$ 7.318	5.543 $\pm$ 739	4.980 $\pm$ 2.152	43.260 $\pm$ 8.936

La producción media global ( $\pm$  desviación estándar,  $n=40$ ) fue de: 1) pimiento rojo:  $35.791 \pm 5.581 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ; 2) pimiento rojo seco:  $5.173 \pm 814 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ; 3) pimiento verde:  $4.479 \pm 1.645 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . La producción media total fue de  $40.271 \pm 6.486 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ .

El análisis estadístico mediante análisis de la varianza a una vía (tratamiento) no mostró diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre tratamientos para la producción de pimiento rojo, pimiento rojo seco, pimiento verde y producción total de pimiento. En la Tabla 3.26 se recogen los resultados de los ANOVAs de la producción para la primera campaña.

**Tabla 3.26.** Efecto del tratamiento en la producción de pimiento rojo, rojo seco, verde y total en la Campaña 2.008-2.009. ANOVAs con un factor fijo.

Producción	Fuente	SC	gl	CM	F	P
Pimiento rojo	Tratamiento	0,00	9	0,00	0,62	0,77
	Residuos	0,17	30	0,01		
Pimiento rojo seco	Tratamiento	0,03	9	0,00	0,58	0,80
	Residuos	0,16	30	0,01		
Pimiento verde	Tratamiento	0,30	9	0,03	0,83	0,59
	Residuos	1,21	30	0,04		
Producción total	Tratamiento	0,03	9	0,00	0,63	0,76
	Residuos	0,18	30	0,01		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad

## B. Campaña 2009-2010

### B.1. Resultados

Los tratamientos aplicados en la segunda campaña y sus valores medios  $\pm$  desviación estándar ( $n=4$ ) de producción de pimiento se especifican en la Tabla 3.27. En esta campaña destacaron los valores de producción de pimiento verde, ya que, aproximadamente, duplicaron la producción de pimiento rojo. La elevada producción de pimiento verde se produjo por el desarrollo ralentizado del cultivo durante este verano.

**Tabla 3.27.** Producción media  $\pm$  desviación estándar ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) de pimienta roja, pimienta roja seca, pimienta verde y producción total de los tratamientos ensayados en la campaña 2009-2010.

Tratamientos	Pimiento rojo ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Pimiento rojo seco ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Pimiento verde ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Producción total ( $\text{kg ha}^{-1}$ )
<i>B. nigra</i>	9.840 $\pm$ 4.615	1.547 $\pm$ 879	16.275 $\pm$ 5.294	26.115 $\pm$ 2.726
<i>B. nigra</i> + P	7.290 $\pm$ 5.518	1.068 $\pm$ 808	15.900 $\pm$ 6.885	23.190 $\pm$ 2.728
<i>S. alba</i>	12.600 $\pm$ 3.270	1.874 $\pm$ 664	18.840 $\pm$ 7.865	31.440 $\pm$ 5.559
<i>S. alba</i> + P	7.584 $\pm$ 5.990	971 $\pm$ 675	13.413 $\pm$ 6.148	26.250 $\pm$ 1.590
Testigo	9.630 $\pm$ 5.506	1.482 $\pm$ 957	15.300 $\pm$ 5.630	24.930 $\pm$ 3.926
Testigo + P	6.288 $\pm$ 4.975	947 $\pm$ 798	11.952 $\pm$ 5.536	22.800 $\pm$ 8.150

La producción media global ( $\pm$  desviación estándar,  $n=24$ ) fue de: 1) pimienta roja: 9.450  $\pm$  4.798  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ; 2) pimienta roja seca: 1.395  $\pm$  763  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ; 3) pimienta verde: 16.338  $\pm$  5.714  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . La producción media total fue igual a 25.788  $\pm$  5.044  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , siendo esta bastante menor que en la campaña anterior.

Como puede observarse en la Tabla 3.28, el análisis estadístico mediante análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ( $P>0,05$ ) de producción de pimienta roja, roja seca, verde y total para el factor tratamiento.

**Tabla 3.28.** Efecto del tratamiento en la producción de pimienta roja, roja seca, verde y total en la Campaña 2009-2010. ANOVAs con un factor fijo.

Producción	Fuente	SC	gl	CM	F	P
Pimiento rojo	Tratamiento	0,26	5	0,05	0,68	0,64
	Residuos	1,39	18	0,08		
Pimiento rojo seco	Tratamiento	0,28	5	0,06	0,66	0,66
	Residuos	1,52	18	0,08		
Pimiento verde	Tratamiento	0,03	5	0,01	0,16	0,98
	Residuos	0,64	18	0,04		
Producción total	Tratamiento	0,06	5	0,01	1,60	0,21
	Residuos	0,13	18	0,01		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad

## C. Campaña 2010-2011

### C.1. Resultados

Las producciones de pimienta obtenidas para cada uno de los tratamientos evaluados en esta campaña se especifican en la Tabla 3.29. Los valores de producción media global ( $\pm$  desviación estándar,  $n=30$ ) fueron: 1) pimienta roja:  $37.064 \pm 8.695 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ; 2) pimienta roja seco:  $5.792 \pm 1.296 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . La producción media total de pimienta fue de  $42.648 \pm 10.476 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ .

**Tabla 3.29.** Producción media  $\pm$  desviación estándar ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) de pimienta roja, pimienta roja seco, pimienta verde y producción total de los tratamientos ensayados en la campaña 2010-2011.

Tratamientos	Pimienta roja ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Pimienta roja seco ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Pimienta verde ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	Producción total ( $\text{kg ha}^{-1}$ )
<i>B. nigra</i> + P	$31.320 \pm 7.351$	$4.762 \pm 852$	$2.640 \pm 1.693$	$33.960 \pm 8.782$
<i>B. nigra</i> + TC1 + P	$38.080 \pm 6.782$	$6.373 \pm 1.682$	$6.600 \pm 2.726$	$44.680 \pm 9.469$
<i>B. nigra</i> + TC2 + P	$44.600 \pm 6.846$	$6.970 \pm 1.189$	$6.440 \pm 1.327$	$51.040 \pm 8.037$
<i>S. alba</i> + P	$31.680 \pm 4.901$	$4.954 \pm 886$	$4.320 \pm 1.046$	$36.000 \pm 4.164$
<i>S. alba</i> + TC1 + P	$32.440 \pm 11.014$	$5.168 \pm 1.481$	$4.640 \pm 2.547$	$37.080 \pm 13.552$
<i>S. alba</i> + TC2 + P	$44.640 \pm 13.825$	$7.131 \pm 2.003$	$7.630 \pm 421$	$52.000 \pm 14.178$
Testigo	$38.680 \pm 10.240$	$5.443 \pm 491$	$3.640 \pm 1.391$	$42.320 \pm 9.820$
Testigo + P	$34.680 \pm 5.108$	$5.236 \pm 1.027$	$2.680 \pm 1.566$	$37.360 \pm 6.671$
Testigo + TC1 + P	$37.400 \pm 5.869$	$5.794 \pm 826$	$8.080 \pm 1.584$	$45.480 \pm 7.092$
Testigo + TC2 + P	$37.120 \pm 11.704$	$4.565 \pm 1.059$	$9.440 \pm 5.411$	$46.560 \pm 14.848$

TC1: Torta de colza, a razón de  $7.000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . TC2: Torta de colza, a razón de  $14.000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$

El análisis estadístico mediante análisis de la varianza a una vía (tratamiento) no mostró diferencias significativas ( $P>0,05$ ) para la producción de pimienta roja, roja seco y producción total entre los tratamientos aplicados (Tabla 3.30). Sin embargo, la producción de pimienta verde mostró valores de producción significativamente diferentes ( $P<0,05$ ) entre tratamientos. A un nivel de significación del 0,05, el test de Tukey solo diferenció un grupo homogéneo entre los tratamientos.

Aunque no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, en general, las producciones totales fueron mayores en los tratamientos en los que se añadió torta de colza.

**Tabla 3.30.** Efecto del tratamiento en la producción de pimiento rojo, rojo seco, verde y total en la Campaña 2010-2011. ANOVAs con un factor fijo.

<b>Producción</b>	<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Pimiento rojo	Tratamiento	0,08	9	0,01	0,77	0,65
	Residuos	0,24	20	0,01		
Pimiento rojo seco	Tratamiento	0,10	9	0,01	1,27	0,31
	Residuos	0,17	20	0,01		
Pimiento verde	Tratamiento	1,23	9	0,14	2,78	0,03
	Residuos	0,98	20	0,05		
Producción total	Tratamiento	0,12	9	0,01	1,05	0,44
	Residuos	0,25	20	0,01		

**SC:** suma de cuadrados. **gl:** grados de libertad. **CM:** cuadrados medios. **F:** F-Fisher. **P:** probabilidad

## **D. Campaña 2011-2012**

### **D.1. Resultados**

En la Tabla 3.31 se recogen los valores medios ( $\pm$  desviación estándar,  $n=4$ ) de la producción de pimiento para los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización aplicados en la última campaña del estudio de campo.

A diferencia de las campañas anteriores, el cultivo de pimiento para pimentón en el verano de 2012 presentó diferencias significativas ( $P<0,05$ ) de producción de pimiento rojo, rojo seco, verde y total para el factor tratamiento, como puede observarse en la Tabla 3.32. El test de Tukey diferenció varios grupos homogéneos para las distintas categorías de pimiento estudiadas (Tabla 3.31).

En general, los tratamientos que presentaron mayor producción de pimiento fueron aquellos en los que se incorporó torta de colza y BioFence. Por el contrario, los tratamientos de menor producción fueron los tratamientos Testigo y Testigo + P.

**Tabla 3.31.** Producción media  $\pm$  desviación estándar (n=4) (kg·ha<sup>-1</sup>) de pimiento rojo, pimiento rojo seco, pimiento verde y producción total de los tratamientos ensayados en la campaña 2011-2012.

Tratamientos	Pimiento rojo (kg ha <sup>-1</sup> )	Pimiento rojo seco (kg ha <sup>-1</sup> )	Pimiento verde (kg ha <sup>-1</sup> )	Producción total (kg ha <sup>-1</sup> )
MB + BioFence	44.595 $\pm$ 5.690 cd	12.017 $\pm$ 1.642 cd	10.425 $\pm$ 3.200 cd	55.020 $\pm$ 2.617 ce
MB + BioFence + P	39.765 $\pm$ 11.199 cd	10.828 $\pm$ 2.851 cd	6.255 $\pm$ 399 ac	46.020 $\pm$ 10.910 cd
MB + TC	53.490 $\pm$ 10.635 d	13.577 $\pm$ 2.645 d	8.664 $\pm$ 4.839 ad	62.154 $\pm$ 15.074 ce
MB + TC + P	46.860 $\pm$ 8.405 cd	11.657 $\pm$ 2.225 cd	20.010 $\pm$ 3.639 d	66.870 $\pm$ 10.060 de
Testigo	25.350 $\pm$ 3.183 ab	6.654 $\pm$ 1.265 ab	3.030 $\pm$ 1.818 a	28.380 $\pm$ 1.894 ab
Testigo + P	19.050 $\pm$ 5.930 a	5.043 $\pm$ 1.406 a	3.765 $\pm$ 2.018 ab	22.815 $\pm$ 7.044 a
Testigo + BioFence	41.235 $\pm$ 2.134 cd	10.738 $\pm$ 502 cd	6.120 $\pm$ 961 ac	47.355 $\pm$ 1.773 ce
Testigo + BioFence + P	33.675 $\pm$ 3.770 bc	8.537 $\pm$ 1.154 bc	8.055 $\pm$ 3.071 bd	41.730 $\pm$ 6.773 bc
Testigo + TC	53.190 $\pm$ 3.396 d	13.052 $\pm$ 828 d	17.130 $\pm$ 7.344 cd	70.320 $\pm$ 4.622 e
Testigo + TC + P	46.065 $\pm$ 3.573 cd	11.572 $\pm$ 1.232 cd	15.375 $\pm$ 4.221 cd	61.440 $\pm$ 4.705 ce

Los valores seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo al test de Tukey (P>0,05).

TC: Torta de Colza, 7.000 kg·ha<sup>-1</sup>; BioFence®: pellets de *B. carinata*, 3.000 kg·ha<sup>-1</sup>

**Tabla 3.32.** Efecto del tratamiento en la producción de pimiento rojo, rojo seco, verde y total en la Campaña 2011-2012. ANOVAs con un factor fijo.

Producción	Fuente	SC	gl	CM	F	P
Pimiento rojo	Tratamiento	0,78	9	0,09	14,18	0,00
	Residuos	0,18	30	0,01		
Pimiento rojo seco	Tratamiento	0,71	9	0,08	13,58	0,00
	Residuos	0,18	30	0,01		
Pimiento verde	Tratamiento	2,97	9	0,33	8,67	0,00
	Residuos	1,14	30	0,04		
Producción total	Tratamiento	0,97	9	0,11	19,66	0,00
	Residuos	0,16	30	0,01		

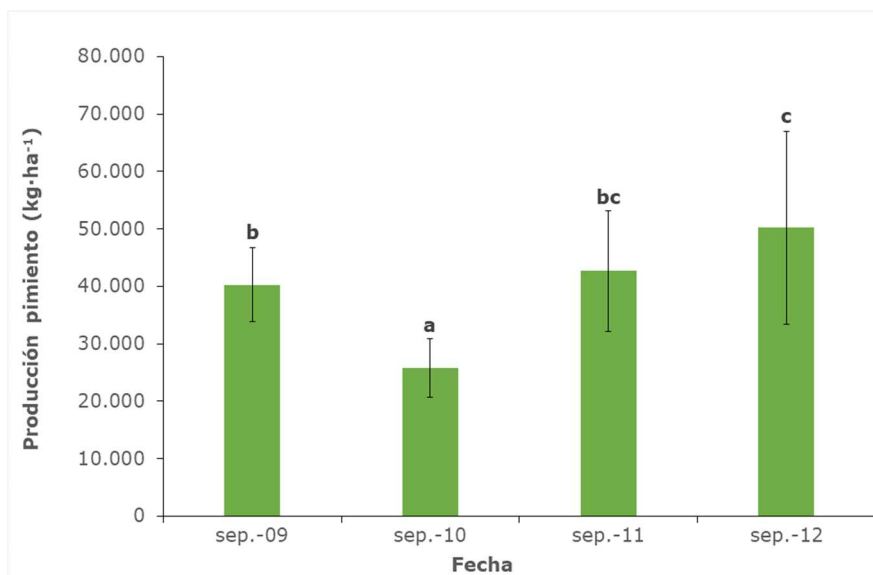
SC: suma de cuadrados. gl: grados de libertad. CM: cuadrados medios. F: F-Fisher. P: probabilidad

## E. Evolución de la producción de pimiento

La producción total de pimiento para pimentón no ha sido homogénea en las diferentes campañas de estudio. Los mayores valores de producción de pimiento se registraron en la última campaña, mientras que en la segunda campaña se obtuvieron los valores más bajos de producción. En la Figura 3.22 se representan los cambios en la producción total de pimiento para pimentón a lo largo del estudio de campo.



El análisis estadístico mediante análisis de la varianza a una vía (fecha) mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de producción total de pimiento para el factor fecha ( $F = 25,74$ ). El test de Tukey agrupó las fechas en tres grupos homogéneos, como puede observarse en la Figura 3.22.



**Figura 3.22.** Producción media global  $\pm$  desviación estándar (kg·ha<sup>-1</sup>) de pimiento para pimentón estimada en el mes de septiembre de cada una de las campañas ensayadas. Las barras seguidas de la misma letra no difieren significativamente, de acuerdo al test de Tukey ( $P > 0,05$ ).

## F. Discusión

Los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización no tuvieron un efecto significativo en la producción de pimiento para pimentón en las tres primeras campañas del estudio. En otras palabras, los tratamientos aplicados no mejoraron la producción con respecto al tratamiento testigo en los tres primeros años del estudio. Ni el uso de brásicas en verde, ni la adición de torta de colza o el uso del plástico contribuyeron a un incremento de la productividad del suelo.

En la tercera campaña, como excepción, la producción de pimiento verde mostró diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, al comparar las medias mediante el test de Tukey solo se diferenció un grupo homogéneo al

nivel de significación considerado, esto es, las medias de producción de pimiento verde de los tratamientos no difirieron significativamente unas de otras.

Al contrario, si se observaron diferencias significativas de producción para todas las categorías de pimiento (rojo, rojo seco, verde y producción total) en la última campaña de estudio. Los tratamientos aplicados en esta campaña incrementaron la producción con respecto al tratamiento testigo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por varios autores, como Kirkegaard y Matthiessen (2004) que obtuvieron mejoras en el rendimiento de los cultivos después de aplicar enmiendas de brásicas. Lazzeri *et al.* (2003) demostraron que la biofumigación usando *B. juncea* incrementó la cosecha de fresas aproximadamente un 20 % respecto al tratamiento control. Mitidieri *et al.* (2009) concluyeron que las secuencias de los tratamientos biofumigantes (estiércol/brócoli y colza/brócoli) presentaron los valores más altos de producción total y comercial para el cultivo de lechuga. Hansen y Keinath (2013) observaron una mayor producción de pimiento en los tratamientos biosolarizados usando crucíferas (*B. juncea*, *B. napus* y *R. sativus*) y plástico VIF comparado con los tratamientos testigo con y sin VIF.

Por otra parte, en la última campaña las mayores producciones de pimiento se registraron en los tratamientos en los que se había incorporado torta de colza, seguidos de los tratamientos con adición de BioFence®. Sin embargo, las producciones de los tratamientos Testigo y Testigo + P fueron significativamente inferiores a las del resto de tratamientos. Concretamente, la producción total del tratamiento Testigo + P fue aproximadamente 3 veces inferior a la producción del tratamiento Testigo + TC.

El aumento de la producción por el uso de harinas de semilla ha sido descrito por otros autores. Kucke (1993) aplicó torta de colza como fertilizante en cultivos de trigo, cebada y remolacha azucarera, mostrando mejores resultados en la producción y calidad de la cosecha. Wang *et al.* (2014) observaron mayores producciones de pimiento en los tratamientos de biofumigación con harina de semilla de *B. napus* con respecto al testigo no tratado

y el tratamiento fumigado con dazomet. Otros investigadores observaron que el uso de la harina de semilla de *B. napus* como enmienda del suelo incrementó el contenido de nitrógeno total en el suelo de invernadero y huertos, además, las hojas de manzano presentaron un elevado contenido de nitrógeno (Mazzola *et al.*, 2001). Las harinas de semilla desengrasada de especies de *Brassicaceae* constituyen una fuente de nitrógeno en los sistemas de producción agrícola, ya que contienen un porcentaje del 5-6 % de nitrógeno y tienen una relación C:N de 8:1 (Gale *et al.*, 2006). Además, las harinas contienen otros nutrientes esenciales que pueden ser mineralizados y contribuir en el incremento de producción de los cultivos (Snyder *et al.*, 2009).

El BioFence® es un producto comercial que se usa como biofumigante y como fertilizante por su composición química: 84,2 % M.O., 6 % N, 7 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> %, 4,4 % SO<sub>3</sub>, 2,6 % K<sub>2</sub>O y 0,9 % MgO (<http://www.triumphitalia.com>). La adición de pellets de *B. carinata* (BioFence®) incrementó significativamente la producción de pimiento con respecto al tratamiento testigo en nuestro estudio de campo. Esta mejora de la cosecha coincide con los resultados de otros estudios. Chamorro *et al.* (2015) evaluaron tratamientos de biosolarización y biofumigación con BioFence® en cultivos de fresa en Moguer (Huelva). Solamente los tratamientos de biosolarización incrementaron de forma significativa la producción comercial de fresa respecto al control. Núñez-Zofío *et al.* (2012) observaron un incremento en la producción de pimiento por la aplicación reiterada de tratamientos de biosolarización con pellets de *B. carinata* (BioFence®) y *S. alba*. Hernández (2011) estudió el efecto de la biosolarización con BioFence®, solo o con estiércol fresco de ovino, obteniendo producciones similares a las del tratamiento de bromuro de metilo en invernaderos de Murcia.

Por otra parte, aunque los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización no generaron cambios significativos de producción en la mayoría de las campañas, la aplicación reiterada de los mismos ha contribuido a aumentar la producción media de pimiento. Los datos de producción de la Campaña 2009-2010 constituyen una excepción, por los valores atípicos de producción. En la

última campaña, la producción media global de pimiento aumentó un 19,79 % y 15,06 % con respecto a la primera y tercera campaña. Medina-Mínguez *et al.* (2012) observaron que la aplicación de métodos no químicos (p.ej. biosolarización) durante 10 años, produjeron un efecto aditivo año tras año, mejorando progresivamente la productividad del suelo objeto de estudio.

Los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización, la rotación de cultivos, la adición de compost, el incremento de la materia orgánica y otros nutrientes, además del descenso de la densidad aparente han contribuido a incrementar la producción de pimiento de este estudio de campo.

### **3.7. Efecto de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización en la microbiota fúngica del suelo**

En el suelo, los microorganismos son los componentes más importantes ya que desarrollan un amplio espectro de acciones, estas inciden en el desarrollo y la nutrición vegetal (Pérez, 2014). Para los especialistas del suelo, la fracción microbiológica está compuesta fundamentalmente por hongos, bacterias, actinomicetos, algas, protozoos y nematodos (Tello *et al.*, 2011).

Los microorganismos influyen en los ecosistemas del suelo contribuyendo en la nutrición de las plantas (George *et al.*, 1995; Timonen, 1996), la sanidad vegetal (Srivastava *et al.*, 1996; Fillion *et al.*, 1999), la estructura del suelo (Wright y Upadhyaya, 1998) y la fertilidad del suelo (Yao *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2001).

Tello (1988) describió el suelo como un ente vivo, sede de interacciones complejas y desconocidas de las poblaciones microbianas que lo habitan. Las interacciones pueden ser de varias categorías, como protocooperación, comensalismo, mutualismo, neutralismo, competición, amensalismo, predación y parasitismo (Pérez, 2014).

Uno de los beneficios de la materia orgánica, adicionales a la práctica de la biofumigación, es la mejora de las propiedades biológicas del suelo al estimular la actividad microbiana e incrementar la presencia de enzimas en el suelo (Bello *et al.*, 1999).

El tipo de suelo es considerado un factor primario en la determinación de la composición y/o función de las especies fúngicas (Gelsomino *et al.*, 1999; Rasche *et al.*, 2006). Por otra parte, las prácticas culturales, incluyendo la rotación de cultivos y las aplicaciones de fertilizantes y desinfectantes, influyen en la naturaleza y composición de las especies fúngicas (Subba Rao, 1999). La cantidad y disponibilidad de materia orgánica presente en el suelo tiene una relación directa con el número de hongos que se encuentran en él ya que la mayoría de ellos poseen una nutrición heterótrofa (Subba Rao, 1999).

### 3.7.1. Material y métodos

El estudio de las variaciones en la microbiota fúngica del suelo se realizó en la última campaña (2011-2012) y los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

- Mezcla biofumigante + BioFence (MB + BioF)
- Mezcla biofumigante + BioFence + Plástico (MB + BioF + P)
- Mezcla biofumigante + torta de colza (MB + TC)
- Mezcla biofumigante + torta de colza + Plástico (MB + TC + P)
- Testigo (T)
- Testigo + Plástico (T + P)
- Testigo + BioFence (T + BioF)
- Testigo + BioFence + Plástico (T + BioF + P)
- Testigo + torta de colza (T + TC)
- Testigo + torta de colza + Plástico (T + TC + P)

La mezcla biofumigante consistió en la siembra al 50 % de semillas de *Sinapis alba* y *Brassica nigra*, a una dosis de 12,5 kg·ha<sup>-1</sup>. Los materiales que se

añadieron en el momento de la incorporación de los cultivos fueron la torta de colza (14.000 kg·ha<sup>-1</sup>) y BioFence® (3.000 kg·ha<sup>-1</sup>).

### **3.7.1.1. Muestreo**

Las muestras de suelo para el análisis de la microbiota fúngica se recogieron antes y después de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización, el 23 de marzo y 11 de mayo de 2012, respectivamente.

Las muestras de suelo recogidas en cada parcela estaban formadas por un total de 5 submuestras tomadas en “cinco de oros”, con un volumen aproximadamente de 500 ml. Con respecto al procedimiento para el muestreo, en primer lugar se eliminó la capa superficial del suelo y, a continuación, la submuestra se recogió de los primeros 10-15 cm del suelo. Las herramientas fueron desinfectadas entre parcela y parcela mediante flameado con alcohol.

La microbiota fúngica total se analizó en muestras compuestas de las 4 repeticiones de cada tratamiento, mientras que el análisis de la microbiota fusárica se realizó en cada una de las parcelas.

### **3.7.1.2. Métodos de análisis**

#### **3.7.1.2.1. Análisis de la microbiota fúngica total**

Las muestras fueron conservadas en la nevera a 4 °C hasta el momento del análisis. El método analítico empleado fue el descrito por Tello *et al.* (1991) y utilizado por Martínez *et al.* (2009). De cada muestra compuesta se pesaron 10 g de suelo y se añadieron a un matraz Erlenmeyer con 90 ml de agua destilada estéril. Se homogeneizaron en placa agitadora y se tomaron, con una pipeta, 5 ml que se añadieron a un matraz con 45 ml de agua destilada estéril, conformando la dilución 10<sup>-2</sup>. De esta nueva dilución se cogieron 5 ml y se incorporaron a otro frasco de 45 ml, obteniéndose la dilución 10<sup>-3</sup>, y así sucesivamente. Los ensayos preliminares para la puesta a punto de la técnica indicaron que la dilución 10<sup>-4</sup> era la más idónea para representar la microbiota

fúngica total del suelo objeto de estudio, ya que el número de colonias estaba comprendido entre 12-62 (Rouxel y Bouhot, 1971).

Una vez obtenida la dilución  $10^{-4}$ , se analizaron 10 ml repartidos en 10 placas de Petri (90 mm) a razón de 1 ml por placa. A continuación, se añadieron a cada placa 10 ml de medio agar-malta acidificado (agar malta + 0,25 % de ácido cítrico) fundido, y el contenido se homogeneizó mediante suaves movimientos. Las placas se incubaron a 25 °C y oscuridad durante 6-8 días. Transcurrido este tiempo, se contaron e identificaron las colonias. La identificación se realizó con el microscopio (objetivos 10x y 40x) y usando las claves taxonómicas de Sutton (1980).

Los datos se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco ( $\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1}$ ), para ello se aplicó la siguiente fórmula (Fernández, 2006):

$$\text{u. f. c. / g suelo seco} = \frac{\text{NC} \cdot \frac{1}{\text{FD}} \cdot \frac{1}{v}}{(P \cdot \text{FH})}$$

NC: nº colonias por placa

FD: factor de dilución

v: volumen empleado

P: peso de la muestra húmeda

FH: factor de corrección de la humedad =  $\left(1 - \left(\frac{\% \text{ humedad}}{100}\right)\right)$

La determinación de la humedad de cada una de las muestras se estimó por diferencia de pesos de las muestras pesadas antes y después de ser secadas en horno a 105 °C durante 48 h.

### **3.7.1.2.2. Análisis de la microbiota fusárica**

Las muestras de suelo fueron desecadas a temperatura ambiente, posteriormente, se trituraron con un mortero de porcelana y se tamizaron con un tamiz de 200  $\mu\text{m}$  de luz. Tanto el mortero como el tamiz se desinfectaron entre muestra y muestra flameando con alcohol.

Para el análisis de la microbiota fusárica se siguió el método descrito por Tello *et al.* (1991), Rodríguez-Molina (1996) y Picón-Toro (2011) basado en añadir una pequeña cantidad de tierra a analizar al medio selectivo de Komada (1975) en fusión. Por cada muestra muestra de tierra a analizar se prepararon cuatro tubos eppendorf de 1 ml con una cantidad de tierra comprendida entre 0,0008 g y 0,9200 g. El medio Komada se enfrió hasta 40-42 °C y se dispensó en placas de Petri de vidrio (90 mm) a razón de 8 ml por placa y en fusión se añadió la tierra contenida en cada uno de los tubos, homogeneizándose con ligeros movimientos. Las placas se incubaron a 25-28 °C bajo luz fluorescente continua durante 5 días. Pasado este tiempo, se contabilizaron las colonias de cada especie de *Fusarium* en todas las placas. La identificación de las especies de este género se realizó mediante la observación directa de las características de las colonias en medio Komada, y en ocasiones, con ayuda del microscopio. Se utilizaron los criterios de Nelson *et al.* (1983) para la identificación de las especies de *Fusarium*.

Los resultados fueron expresados en ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco.

### **3.7.2. Análisis de los datos**

Los datos de la microbiota fúngica total y fusárica fueron analizados mediante análisis de la varianza con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.II. (Statistical Graphics Corp.). Previo al análisis, los datos fueron transformados mediante la expresión  $\sqrt{(x + 0,5)}$  (Rodríguez-Molina, 1996; Martínez *et al.*, 2009) para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Para evaluar el efecto de los tratamientos en la densidad de la microbiota fúngica total y fusárica se realizaron análisis de la varianza antes y después de la aplicación de los tratamientos. A continuación, si el efecto de los tratamientos era significativo ( $P < 0,05$ ), las medias fueron comparadas mediante el test de



mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher que agrupó los tratamientos en varios grupos homogéneos.

También se realizaron análisis estadísticos mediante ANOVAs para valorar si la presencia del cultivo (mezcla biofumigante) generaba diferencias significativas en las densidades de las poblaciones fúngicas antes de aplicar los tratamientos.

Con el objetivo de contrastar las poblaciones fúngicas antes y después de los tratamientos, para cada género y/o especie fusárica y tratamiento se compararon las densidades mediante análisis de varianza a una vía (fecha). Posteriormente, las medias se compararon con el test (LSD) de Fisher.

### **3.7.3. Resultados y discusión**

#### **3.7.3.1. Análisis de la microbiota fúngica total**

Dentro del complejo de microorganismos que forman parte del agroecosistema, el papel de los hongos saprobios es contribuir a la descomposición de la materia orgánica, al ciclo de los nutrientes (Martínez, 1999) y a la estabilización de los agregados del suelo (Van Veen y Kuikman, 1990). Los géneros encontrados comúnmente en el suelo y que se pueden aislar por métodos convencionales son: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Gliocladium*, *Monillia*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pulularia*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Pythium*, *Chaetomium* y *Rhizoctonia* (Martínez et al., 2009).

Las especies de hongos aisladas pertenecieron a los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor* y *Rhizopus*. De forma esporádica, se aislaron especies de otros géneros, como *Alternaria*, *Trichoderma*, *Gliocadium* y *Cladosporium*, pero dada su baja incidencia se han incluido en la categoría de “otros géneros” junto con otras especies sin identificar.

En la Tabla 3.33 se recogen las densidades de los géneros fúngicos, principalmente aislados, y de la microbiota fúngica total de las muestras de suelo recogidas antes y después de la aplicación de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. Además, en dicha tabla se especifican los porcentajes de los géneros fúngicos sobre el total de la microbiota fúngica.

En primer lugar, una vez recogidas las muestras antes de aplicar los tratamientos, se hicieron los análisis estadísticos mediante ANOVA a una vía (tratamiento) para los principales géneros y la microbiota fúngica total. Los resultados no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre las muestras tomadas antes de los tratamientos para *Aspergillus* ( $F=1,24$ ), *Fusarium* ( $F=0,36$ ), *Penicillium* ( $F=0,71$ ), *Rhizopus* + *Mucor* ( $F=1,14$ ) y microbiota fúngica total ( $F=1,33$ ). Sin embargo, "otros géneros" presentó diferencias significativas ( $F=2,45$ ;  $P < 0,05$ ), diferenciándose cuatro grupos homogéneos (Tabla 3.33) de acuerdo al test (LSD) de Fisher.

**Tabla 3.33.** Densidad de los principales géneros fúngicos aislados y microbiota fúngica total (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=4$ ) expresado en  $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco y porcentaje de cada género para los diferentes tratamientos antes y después de realizar los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización.

<b>ANTES</b>	<i>Aspergillus</i>		<i>Fusarium</i>		<i>Penicillium</i>		<i>Rhizopus-Mucor</i>		Otros		TOTAL
Tratamiento	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>
MB + BioF	5,95 $\pm$ 3,54	26,3	2,49 $\pm$ 2,98	2,9	0,65 $\pm$ 1,37	11,0	0,76 $\pm$ 1,03	3,4	12,66 $\pm$ 4,68 cd	56,3	22,62 $\pm$ 4,25
MB + BioF + P	10,55 $\pm$ 4,10	43,1	3,48 $\pm$ 3,11	14,2	1,48 $\pm$ 1,51	6,0	0,63 $\pm$ 0,55	2,6	8,34 $\pm$ 3,46 abc	34,1	24,49 $\pm$ 4,50
MB + TC	9,05 $\pm$ 6,67	40,4	4,46 $\pm$ 3,26	19,9	1,80 $\pm$ 0,62	8,0	1,89 $\pm$ 1,12	8,4	8,19 $\pm$ 5,88 a	36,5	22,41 $\pm$ 5,32
MB + TC + P	5,57 $\pm$ 5,07	20,4	2,47 $\pm$ 2,09	9,0	1,39 $\pm$ 2,21	5,1	1,61 $\pm$ 2,64	5,9	16,29 $\pm$ 6,33 d	59,6	27,33 $\pm$ 7,34
T	8,48 $\pm$ 4,00	38,4	3,26 $\pm$ 2,66	14,8	2,17 $\pm$ 1,54	9,9	1,09 $\pm$ 0	4,9	9,56 $\pm$ 3,76 abc	43,4	22,06 $\pm$ 3,90
T + P	8,53 $\pm$ 3,95	40,0	3,06 $\pm$ 4,24	14,4	0,88 $\pm$ 0,86	4,1	0,55 $\pm$ 0,58	2,6	8,31 $\pm$ 3,50 ab	39,0	21,32 $\pm$ 5,08
T + BioF	6,48 $\pm$ 4,81	28,4	1,19 $\pm$ 1,57	5,2	1,30 $\pm$ 1,11	5,7	0,32 $\pm$ 0,52	1,4	13,51 $\pm$ 6,57 bcd	59,2	22,80 $\pm$ 5,64
T + BioF + P	10,29 $\pm$ 8,61	38,6	2,57 $\pm$ 3,28	9,6	0,86 $\pm$ 1,32	3,2	0,64 $\pm$ 0,55	2,4	12,33 $\pm$ 5,88 abcd	46,2	26,70 $\pm$ 7,09
T + TC	7,57 $\pm$ 4,51	32,6	3,35 $\pm$ 3,51	14,4	1,41 $\pm$ 1,35	6,1	0,65 $\pm$ 0,56	2,8	10,28 $\pm$ 4,33 abc	44,2	23,26 $\pm$ 5,40
T + TC + P	9,71 $\pm$ 6,49	37,3	2,45 $\pm$ 3,14	9,4	1,20 $\pm$ 2,01	4,6	1,30 $\pm$ 0,47	5,0	11,73 $\pm$ 5,13 bcd	45,1	26,02 $\pm$ 6,44
MEDIA	8,22 $\pm$ 5,41	34,4	2,68 $\pm$ 3,01	11,2	1,03 $\pm$ 1,41	4,3	0,82 $\pm$ 1,09	3,4			23,90 $\pm$ 5,75
<b>DESPUÉS</b>	<i>Aspergillus</i>		<i>Fusarium</i>		<i>Penicillium</i>		<i>Rhizopus-Mucor</i>		Otros		TOTAL
MB + BioF	2,04 $\pm$ 1,36 bc	8,4	0,71 $\pm$ 1,08 ab	3,0	0,31 $\pm$ 0,49 abc	1,3	17,42 $\pm$ 3,82 d	72,2	3,67 $\pm$ 2,16 b	15,2	24,14 $\pm$ 4,43 bc
MB + BioF + P	0,99 $\pm$ 1,21 ab	2,0	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,0	0,11 $\pm$ 0,35 ab	0,2	19,55 $\pm$ 9,91 d	39,3	29,10 $\pm$ 12,92 f	58,5	49,74 $\pm$ 6,49 f
MB + TC	2,44 $\pm$ 2,38 ab	3,4	0,33 $\pm$ 1,05 ab	0,5	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,0	24,38 $\pm$ 5,33 e	33,8	45,00 $\pm$ 9,45 g	62,4	72,16 $\pm$ 7,81 g
MB + TC + P	2,19 $\pm$ 1,87 bc	12,1	0,63 $\pm$ 0,88 ab	3,5	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,0	8,04 $\pm$ 3,41 bc	44,3	8,35 $\pm$ 2,95 cd	46,0	18,17 $\pm$ 3,52 a
T	10,46 $\pm$ 5,50 d	35,2	4,18 $\pm$ 3,06 c	14,1	0,77 $\pm$ 1,28 bc	2,6	1,10 $\pm$ 0,90 a	3,7	13,21 $\pm$ 6,44 de	44,4	29,73 $\pm$ 7,14 d
T + P	4,90 $\pm$ 2,96 c	17,2	1,52 $\pm$ 2,68 b	5,3	0,54 $\pm$ 0,77 bc	1,9	5,44 $\pm$ 3,04 b	19,5	15,46 $\pm$ 9,39 e	55,5	28,52 $\pm$ 12,59 cd
T + BioF	1,22 $\pm$ 1,77 ab	3,3	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,0	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,0	20,37 $\pm$ 5,01 de	55,1	15,39 $\pm$ 3,44 e	41,6	36,98 $\pm$ 3,74 e
T + BioF + P	0,78 $\pm$ 1,18 a	2,8	0,44 $\pm$ 0,78 ab	1,6	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,0	20,30 $\pm$ 4,65 de	74,1	5,88 $\pm$ 3,88 bc	21,5	27,39 $\pm$ 4,59 cd
T + TC	1,88 $\pm$ 1,76 ab	8,5	0,84 $\pm$ 0,82 b	3,8	0,94 $\pm$ 1,35 c	4,3	8,57 $\pm$ 2,73 c	38,9	9,82 $\pm$ 3,69 cde	44,6	22,05 $\pm$ 3,86 ab
T + TC + P	1,35 $\pm$ 1,39 ab	3,3	1,14 $\pm$ 1,34 b	3,0	0,21 $\pm$ 0,66 ab	0,5	37,45 $\pm$ 5,42 f	91,4	0,83 $\pm$ 1,54 a	2,0	40,99 $\pm$ 4,34 e

MB: Mezcla Biofumigante; BioF: Biofence®; P: Plástico; TC: Torta de Colza; T: Testigo. Para cada género y para la microbiota fúngica total, los valores seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P>0,05$ ) entre los tratamientos, de acuerdo al test (LSD) de Fisher.

Patkowska y Konopinski (2013) señalaron que durante el cultivo, las plantas estimulan o inhiben el desarrollo de particulares poblaciones de microorganismos en el suelo. Con el objetivo de comparar si el cultivo de la mezcla biofumigante (MB) da lugar a diferencias en la microbiota fúngica se realizaron ANOVAs de los tratamientos con y sin cultivo de la mezcla biofumigante. Los resultados no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) de densidad entre la existencia o no de cultivo para ninguno de los géneros fúngicos y la microbiota fúngica total.

Los ANOVAs a una vía (tratamiento) realizados después de aplicar los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para todos los géneros estudiados y la microbiota fúngica total: *Aspergillus* ( $F=8,58$ ), *Fusarium* ( $F=6,11$ ), *Penicillium* ( $F=2,50$ ), *Rhizopus* + *Mucor* ( $F=62,79$ ), "otros géneros" ( $F=33,08$ ) y microbiota fúngica total ( $F=55,61$ ). Posteriormente, para cada género se realizó el test de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher, diferenciándose varios grupos homogéneos entre los tratamientos (Tabla 3.33).

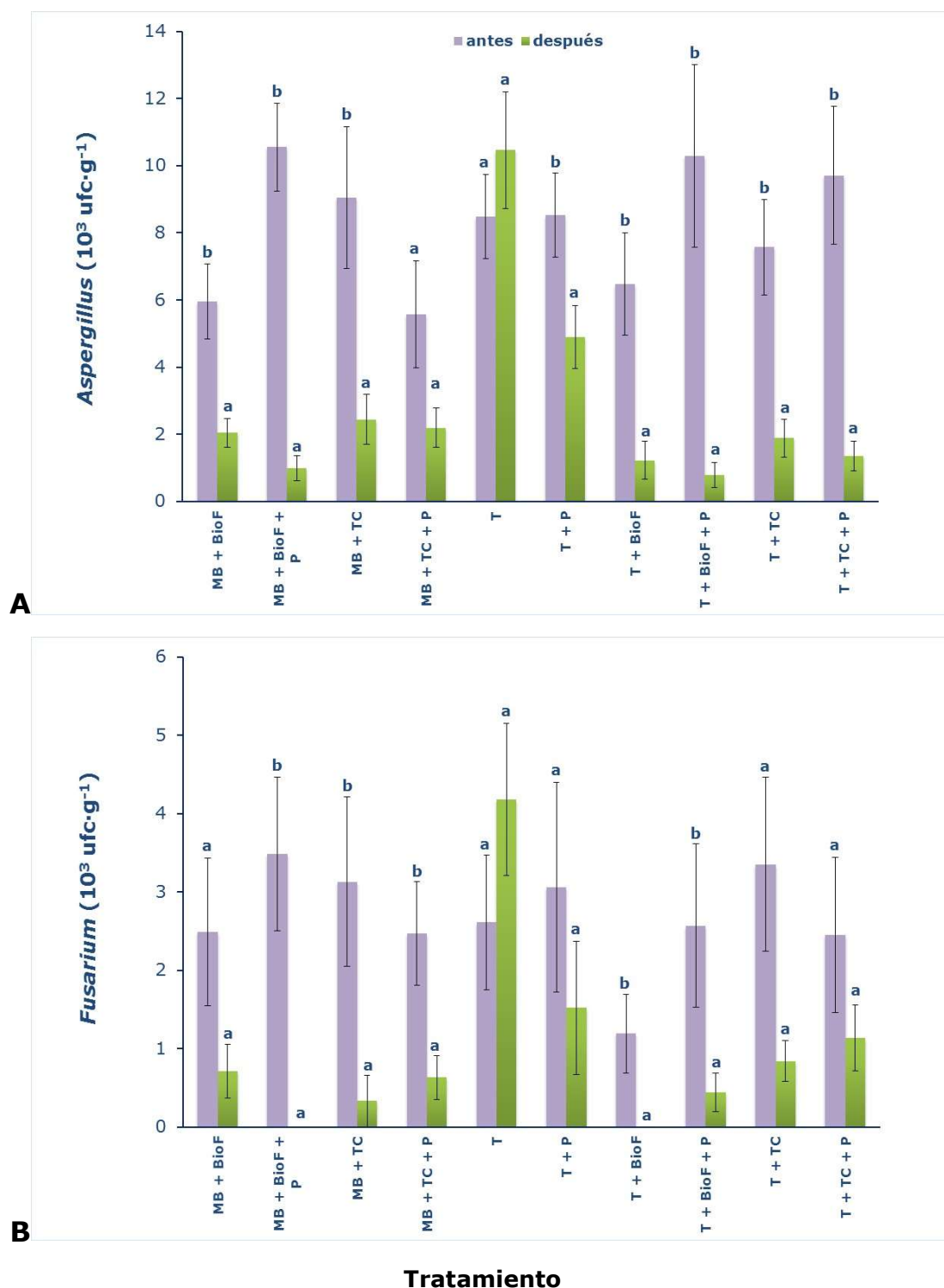
Acorde a los resultados, los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización tuvieron un efecto significativo en las poblaciones fúngicas del suelo. En los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* se redujo la densidad respecto al testigo, mientras que en los géneros *Rhizopus-Mucor* se incrementó después de la aplicación de los tratamientos.

En las Figuras 3.23, 3.24 y 3.25 se representan las densidades de los principales géneros aislados y microbiota fúngica total antes y después de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. Para cada género fúngico y microbiota fúngica total y, a su vez, para cada uno de los tratamientos se realizó un ANOVA a una vía (fecha) para evaluar si existían diferencias significativas entre fechas. A continuación, las fechas se compararon mediante el test (LSD) de Fisher.

La densidad de la población de *Aspergillus* spp. no mostró diferencias entre los tratamientos y fue el género más abundante en la microbiota fúngica total antes de aplicar los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización (Tabla 3.33). En la Figura 3.23.A se pueden observar las variaciones experimentadas por *Aspergillus* spp. por el efecto de los diferentes tratamientos. En general, los tratamientos redujeron de forma significativa la densidad de este género salvo en los tratamientos MB + TC + P y Testigo. En estos tratamientos no hubo diferencias significativas entre la densidad del género *Aspergillus* antes y después de los tratamientos.

Después de la aplicación de los tratamientos, el porcentaje medio inicial de *Aspergillus* se redujo aproximadamente en 4 veces y el tratamiento Testigo fue el que presentó mayor ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco (Tabla 3.33).

En relación al género *Fusarium* destaca la enorme variabilidad que presentan los datos. Antes de aplicar la desinfección el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos para la densidad este género. Sin embargo, si se observaron diferencias para algunos tratamientos después de la aplicación de estos. En la Figura 3.23.B puede observarse que la mitad de los tratamientos aplicados no modificaron significativamente la densidad inicial de este género. Los tratamientos MB + TC, MB + TC + P, T + BioF y T + BioF + P redujeron significativamente la población inicial. Después de la aplicación de los tratamientos, el Testigo fue el que presentó la mayor densidad de *Fusarium* spp. (Tabla 3.33).



**Figura 3.23.** Efecto de los tratamientos de solarización, biofumigación, biosolarización sobre la densidad (valor promedio  $\pm$  error estándar) de los géneros *Aspergillus* (A) y *Fusarium* (B) expresada en  $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco antes y después de los tratamientos. Las barras seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test (LSD) de Fisher.

MB: Mezcla Biofumigante; BioF: Biofence®; P: Plástico; TC: Torta de Colza; T: Testigo.

Con respecto al género *Penicillium*, este representó inicialmente el 4,3 % de la microbiota fúngica total, quedando reducido su porcentaje tras los tratamientos (Tabla 3.33). Y al igual que en los géneros anteriores, los datos mostraron una variabilidad muy alta. En la Figura 3.24.A se representan los cambios experimentados por este género por la aplicación de los diferentes tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. Algunos de los tratamientos no produjeron cambios significativos en la densidad inicial de este género, mientras que otros como MB + BioF + P, MB + TC + P, T + BioF y T + BioF + P la redujeron significativamente. Estos últimos datos contrastan con los obtenidos por Marín-Guirao (2016) que solamente aisló *Penicillium* spp. cuando analizó el BioFence®.

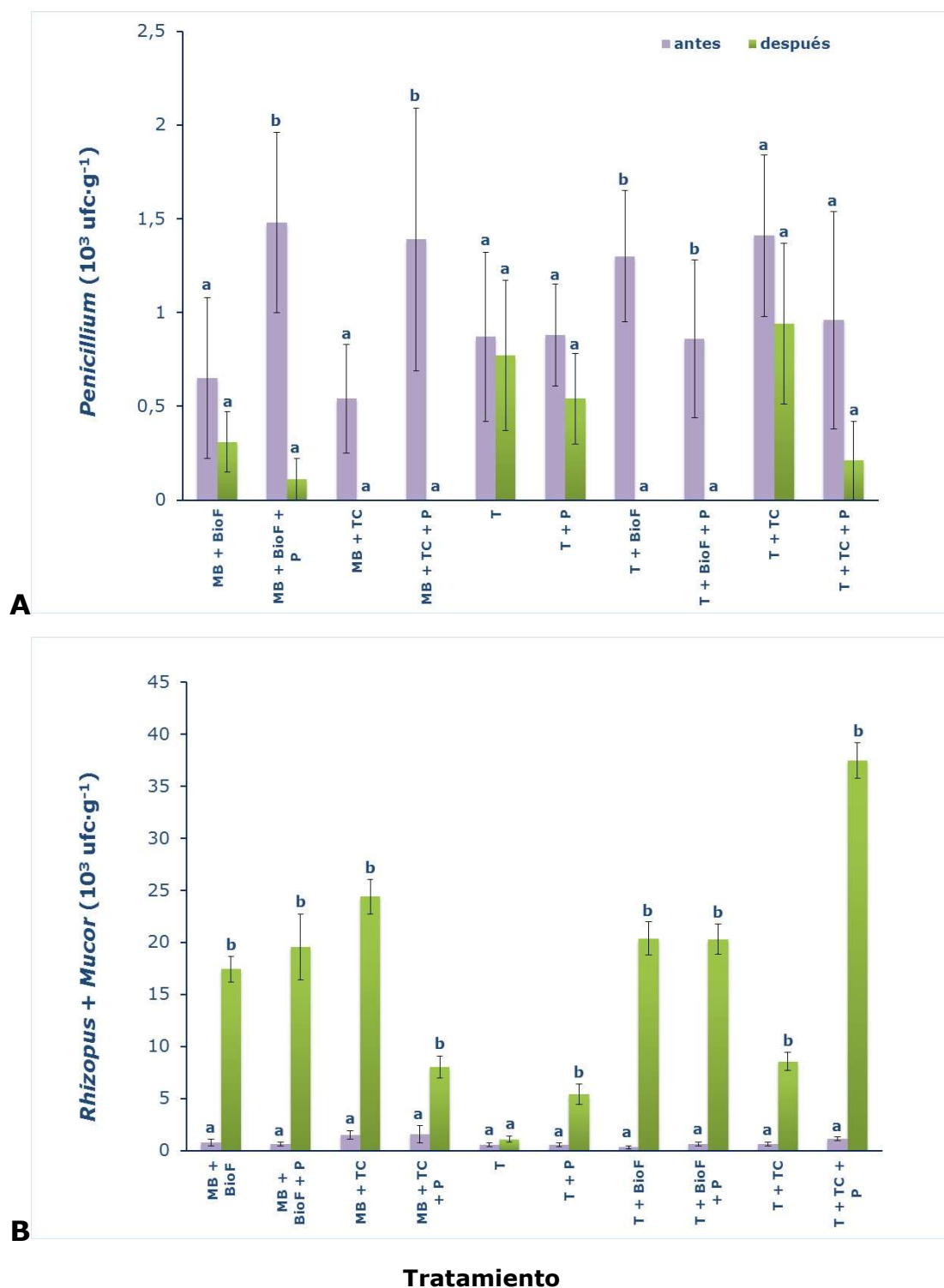
El tratamiento T + TC fue el que presentó mayor densidad de *Penicillium* spp. después de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización (Tabla 3.33).

Con respecto a *Rhizopus* spp. y *Mucor* spp., en las muestras anteriores a los tratamientos dominaban la especies de *Rhizopus* spp. mientras que en las muestras posteriores, el género *Mucor* pasó a ser el predominante, probablemente debido a su capacidad antagónica y rápido crecimiento. Los estudios *in vitro* de Gupta y Tandon (1978) evidenciaron que *Mucor circinelloides* es un destructivo hiperparásito de *Rhizopus nigricans*. Martinez (1999) trabajó con especies de *Mucor* spp. y observó que *Mucor subtilissimus* y *Mucor corticolus* están asociados a la presencia de gran cantidad de azúcares libres procedentes de la descomposición de la celulosa, hemicelulosa y pectinas, que degradan los saprófitos primarios. *Mucor hiemalis* exhibe una estrategia ruderal capturando primero el recurso y esporulando rápidamente antes de su reemplazo por un hongo más combativo (Martinez, 1999).

La aplicación de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización incrementó significativamente las densidades iniciales de estos dos géneros en todos los tratamientos salvo para el Testigo (Figura 3.24.B). Estos géneros pasaron a ser los más abundantes en la microbiota fúngica total, ya que su representación aumentó del 3,4 % al 46,5 %.

En la Figura 3.24.B destaca el incremento de *Rhizopus* spp. y *Mucor* spp. tras la aplicación del tratamiento T + TC + P, que supuso un aumento del 96,52 %. Además, este tratamiento es el que presentó el mayor número de ufc·g<sup>-1</sup> para estos dos géneros. Estos datos difieren de los obtenidos por Wang *et al.* (2014) que no detectaron hongos de la clase *Zygomycetes* en suelos biofumigados con harina de semilla de *B. napus*, mientras que si fueron encontrados en el tratamiento control.





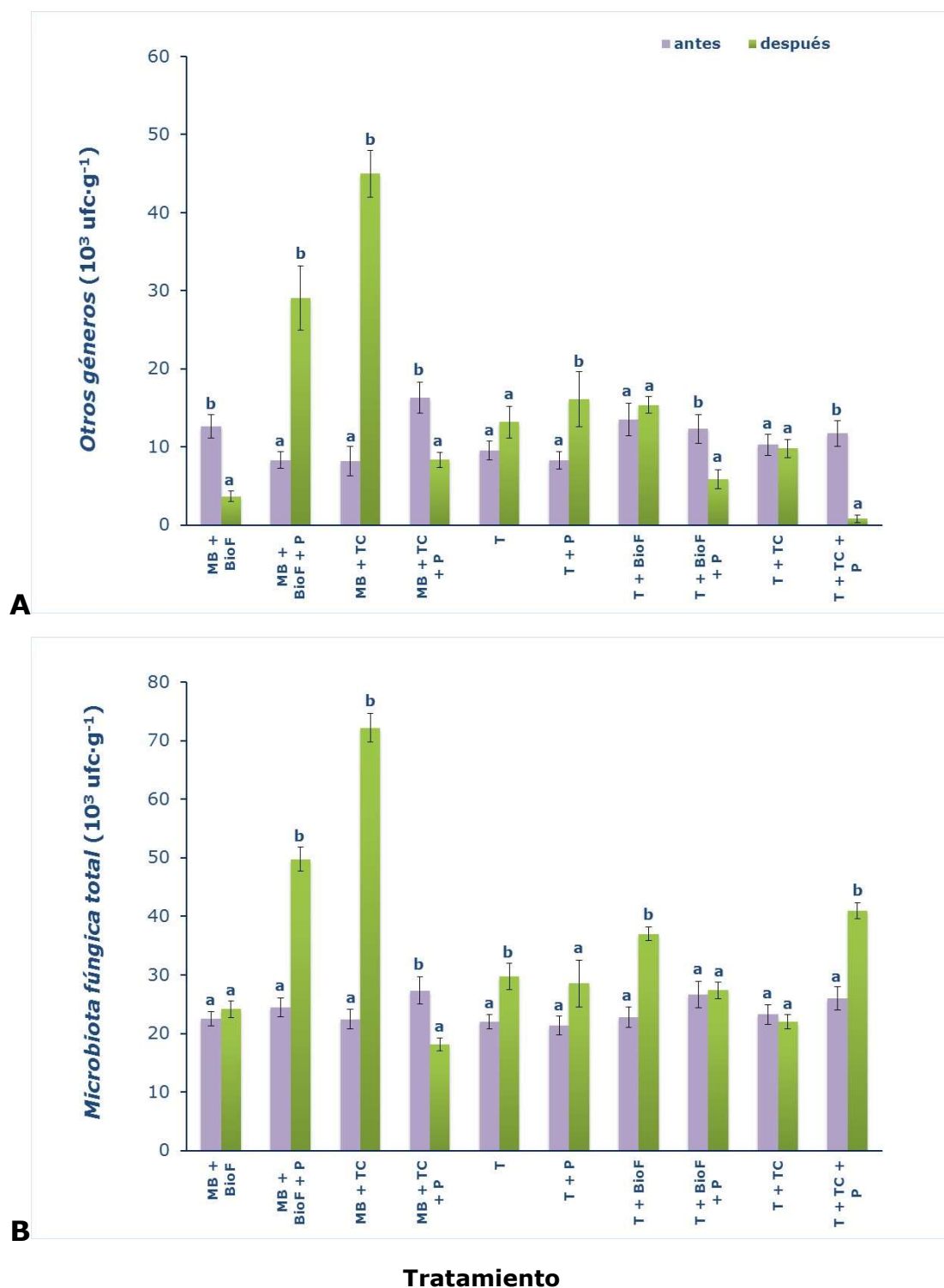
**Figura 3.24.** Efecto de los tratamientos de solarización, biofumigación, biosolarización sobre la densidad (valor promedio  $\pm$  error estándar) de los géneros *Penicillium* (A) y *Rhizopus + Mucor* (B) expresada en  $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco antes y después de los tratamientos. Las barras seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test (LSD) de Fisher.

MB: Mezcla Biofumigante; BioF: Biofence®; P: Plástico; TC: Torta de Colza; T: Testigo.

El grupo “otros géneros” fue muy abundante antes y después de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. Antes de aplicar los tratamientos, este grupo fue el único que mostró diferencias significativas de densidad entre los tratamientos, destacando los tratamientos MB + TC + P y MB + TC por su mayor y menor densidad (Tabla 3.33). Tras aplicar la desinfección, algunos tratamientos redujeron la densidad, otros tratamientos la aumentaron y otros no produjeron cambios significativos (Figura 3.25.A). El tratamiento T + TC + P mostró la menor densidad después de aplicar los tratamientos y el tratamiento MB + TC presentó la mayor densidad, contrastando con la menor densidad de la fecha anterior (Tabla 3.33).

En general, este grupo fue muy diverso y muchas especies no fueron identificadas por las contaminaciones generadas por otros hongos y la ausencia de fructificaciones. Es de importancia señalar que después de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización no se detectó la presencia de especies de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Gliocadium* y *Trichoderma*.

Con respecto a la microbiota fúngica total, antes de la desinfección no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. En la Figura 3.25.B se representan los cambios generados en la microbiota fúngica total para cada tratamiento. Solamente el tratamiento MB + TC + P redujo significativamente la densidad de la microbiota fúngica total (Tabla 3.33). En concordancia con estos datos, Ping *et al.* (2015) observaron un descenso drástico de las poblaciones fúngicas (aproximadamente del 85 %) tras la adición de alil-ITC, además de un cambio en la composición de la microbiota fúngica después de aplicar diferentes ITCs.



**Figura 3.25.** Efecto de los tratamientos de solarización, biofumigación, biosolarización sobre la densidad (valor promedio  $\pm$  error estándar) de “otros géneros”(A) y microbiota fúngica total (B) expresada en  $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco antes y después de los tratamientos. Las barras seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test (LSD) de Fisher.

MB: Mezcla Biofumigante; BioF: Biofence®; P: Plástico; TC: Torta de Colza; T: Testigo.

La aplicación de los tratamientos MB + BioF, T + P, T + BioFence + P y T + TC no modificaron significativamente la densidad inicial de la microbiota fúngica total y el resto de los tratamientos la incrementaron (Figura 3.25.B). El tratamiento MB + TC mostró el mayor número de ufc·g<sup>-1</sup> para la microbiota fúngica total, triplicándose la densidad inicial (Tabla 3.33). YongHong *et al.* (2009) indicaron que la torta de colza introduce una abundante y muy diversa comunidad microbiana.

El tratamiento Testigo destacó por presentar una mayor densidad fúngica después de aplicar los tratamientos (Figura 3.25.B) Las labores de rotovator, pudieron alterar el suelo y justificar el incremento de la microbiota fúngica en estas parcelas.

En general, las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización tuvieron efectos cualitativos y cuantitativos en la micoflora fúngica total. Los cambios experimentados en la microbiota fúngica pudieron estar relacionados con la liberación de compuestos volátiles por los materiales biofumigantes empleados y/o desarrollo de diferentes mecanismos antagonistas.

La composición de la microbiota fúngica se vio alterada por las técnicas de desinfección. Algunos géneros redujeron su representación en las muestras de suelo para la mayoría de los tratamientos (*Aspergillus*, *Fusarium*), mientras que otros incrementaron su presencia (*Rhizopus* y *Mucor*). En este estudio, la rápida colonización de algunos hongos del azúcar, como *Mucor* spp., pudo desplazar a otras especies fúngicas menos competitivas. Wang *et al.* (2014) observaron un cambio en la composición de la microbiota fúngica al aplicar tratamientos de biofumigación con torta de colza, además, la diversidad fúngica del suelo se redujo significativamente.

Los tratamientos implicaron cambios importantes en la densidad y composición de la microbiota fúngica, pero además, pudieron tener consecuencias sobre las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo al

reducirse la presencia de determinados géneros como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Estos juegan un papel muy importante en el ciclo del carbono, descomponiendo el almidón, la celulosa y la quitina (Mayea *et al.*, 1982). Además, actúan como agentes aglutinadores de las partículas del suelo, al secretar sustancias mucilaginosas que favorecen la agregación del suelo (Singh *et al.*, 2008). Estos son los antagonistas fúngicos más abundantes en la rizosfera y rizoplaneo de las plantas (Martín, 1977). El antagonismo es una consecuencia de la interacción que existe entre las poblaciones de microorganismos (Odum, 1972). Dentro de la acción biorreguladora de los antagonistas se han descrito diferentes mecanismos de acción para controlar el desarrollo de hongos patógenos, entre los que se encuentran: antibiosis, competencia (por espacio y nutrientes), interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática) e inducción de resistencia (Leal, 2000).

La desaparición de estos antagonistas después de los tratamientos de desinfección pudo tener consecuencias negativas en el control de *Phytophthora nicotianae* y en las propiedades físico-químicas del suelo. Varios trabajos han demostrado la eficacia de estos géneros antagonistas como agentes controladores de *Phytophthora* spp.: *Aspergillus* spp. frente a *P. capsici* (Noveriza y Quimio, 2004; Wang *et al.*, 2015), *P. palmivora* (Adebola y Amadi, 2010) y *P. erythroseptica* (Aydi Ben Abdallah *et al.*, 2015); *Penicillium* spp. frente a *P. capsici* (Noveriza y Quimio, 2004) y *P. nicotianae* (Fang y Tsao, 1995); *Trichoderma* spp. frente a *P. parasitica* var. *nicotianae* (Borrás *et al.*, 1997), *P. nicotianae* (Singh y Islam, 2010) y *P. infestans* (Fatima *et al.*, 2015). Malajczuk (1983) señaló que las formas más comunes de ejercer antagonismo fúngico frente a *Phytophthora* spp. implicaban el micoparasitismo y/o producción de metabolitos que inhiben el crecimiento o destrucción de los propágulos. *Trichoderma* spp. puede colonizar rápidamente sustratos orgánicos en el suelo y se caracteriza por una elevada tasa de crecimiento, abundante esporulación y producción de distintos antibióticos (Tallapragada y Gudimi, 2011). *Aspergillus* spp. presenta un crecimiento rápido, produce antibióticos (Noveriza y Quimio, 2004) y varios metabolitos antifúngicos, como *nominine*, *aflavinines*, *paspalinine*

y *aspermone* (Gloer, 1995). *Penicillium* spp. ha sido reportado como hongo antagonista de patógenos de plantas con un mecanismo de acción basado en la inducción de resistencia (Hossain *et al.*, 2007), la producción de antibióticos (Nicoletti *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008) y micoparasitismo (Sempere y Santamarina, 2008).

No obstante, los cambios experimentados en la microbiota fúngica también son beneficiosos tanto para la fertilidad del suelo como para el control de *P. nicotianae*. *Rhizopus* y *Mucor*, géneros dominantes después de los tratamientos, favorecen la agregación de las partículas del suelo (Singh *et al.*, 2008) e intervienen en el ciclo del fósforo liberando fosfatos asimilables para las plantas al degradar compuestos carbonados y nitrogenados del suelo (Mayea *et al.*, 1982). Además, estos géneros pueden ejercer un fuerte antagonismo sobre *P. nicotianae* debido a la alta capacidad de proliferación en periodos muy breves de tiempo y producción de metabolitos antifúngicos (Shanker *et al.*, 1993).

Todos los cambios cualitativos y cuantitativos experimentados en la microbiota fúngica total del suelo por los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización pudieron influir en la baja infectividad de *P. nicotianae* (17,2 %) pese a la alta supervivencia del inóculo (88 %) en esta campaña. Por tanto, estos cambios en la microbiota indujeron que el suelo se comportase como supresivo frente a este hongo patógeno.

### **3.7.3.2. Análisis de la microbiota fusárica**

El género *Fusarium* se encuentra ampliamente representado en el suelo objeto de estudio, localizado en la Finca La Orden (Guadajira). En las muestras de suelo se aislaron sistemáticamente tres especies en el medio Komada: *F. oxysporum*, *F. roseum* y *F. solani*.

Los resultados de los análisis de la densidad de la microbiota fusárica del suelo antes y después de realizar los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización se recogen en la Tabla 3.34. En esta tabla se indica

el total de la microbiota fusárica, así como la contribución (%) de cada especie al total de la población fusárica. Previo a la aplicación de los tratamientos, *F. roseum* fue la especie con menor representación en los análisis de tierra (Tabla 3.34). La densidad media de la microbiota fusárica total fue de, aproximadamente,  $2 \cdot 10^4$  ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco. Estos valores fueron muy similares a los obtenidos por Rodríguez-Molina (1996) en muestras recogidas en esta misma finca y diluidas en talco. Sin embargo, el valor medio de la población fusárica total difirió del obtenido mediante la técnica de diluciones seriadas que fue de  $2,68 \cdot 10^{-3}$  ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco. Estas discrepancias son atribuidas a la diferencia de especificidad de las técnicas utilizadas.

Para la fecha anterior a la aplicación de los tratamientos, el análisis de la varianza a una vía (tratamiento) mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos para *F. oxysporum* ( $F=2,09$ ), *F. roseum* ( $F=2,57$ ) y  $F_{\text{total}}$  ( $F=2,43$ ). Sin embargo, la densidad de *F. solani* no presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $F=1,04$ ;  $P > 0,05$ ). Para las especies de *Fusarium* y el total de la población se diferenciaron varios grupos homogéneos entre los tratamientos (Tabla 3.34).

Estas diferencias de densidad de las especies fusáricas entre los tratamientos podrían ser atribuidas al efecto de los tratamientos aplicados en las campañas anteriores. El tratamiento T + P presentó los menores valores para todas las especies de *Fusarium* y para el total de la población, la causa pudo ser la reiteración de este tratamiento en las mismas parcelas durante tres campañas consecutivas. Por el contrario, los tratamientos MB + TC y T + TC fueron los que presentaron los máximos valores para el total de la población fusárica, y se corresponden con los tratamientos *S. alba* + TC2 + P y T + TC1 + P de la campaña anterior. La adición de la torta de colza en la campaña anterior pudo favorecer el incremento de este género en estos tratamientos. De hecho, algunos autores han observado un incremento de *Fusarium* spp. en el suelo por el uso de harinas de semillas de brásicas (Smolinska y Kowalczyk, 2014; Paudel y Carpenter-Boggs, 2014).

Paralelo al análisis de la varianza anterior se realizó otro para comparar las poblaciones de la microbiota fusárica por el efecto del cultivo (mezcla biofumigante). Nash y Snyder (1965) compararon la densidad de *Fusarium* spp. entre un suelo sin cultivar y otro cultivado con crucíferas, este último presentó una densidad tres veces mayor y cambios en la composición de las especies fusáricas. En ese estudio, el análisis de la varianza no mostró diferencias significativas de densidad entre tratamientos con cultivo y sin cultivo para *F. oxysporum* ( $F=0,67$ ), *F. solani* ( $F=0,50$ ) y  $F_{\text{total}}$  ( $F=0,80$ ). Por el contrario, *F. roseum* presentó diferencias significativas ( $F=5,86$ ;  $P<0,05$ ) entre tratamientos sin cultivo ( $5.093 \pm 1.832 \text{ ufc}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y con cultivo ( $5.844 \pm 2.050 \text{ ufc}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

El análisis de la varianza a una vía (tratamiento) de las muestras de suelo tomadas después de aplicar los tratamientos indicaron que todas las especies fusáricas y el total de la población fusárica presentaron densidades significativamente diferentes ( $P<0,05$ ) entre los tratamientos: *F. oxysporum* ( $F=14,22$ ), *F. roseum* ( $F=43,08$ ), *F. solani* ( $F=9,28$ ) y  $F_{\text{total}}$  ( $F=23,27$ ). Posteriormente, se realizó el test de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher, diferenciándose varios grupos homogéneos para cada especie fusárica y población fusárica total (Tabla 3.34). Al igual que para la fecha anterior a la desinfección, el tratamiento T + P presentó los menores valores de densidad para todas las especies de *Fusarium* y el total de la población. En general, los tratamientos MB + TC y MB + BioF presentaron los mayores valores de densidad para todas las especies de *Fusarium* y población fusárica total (Tabla 3.34).

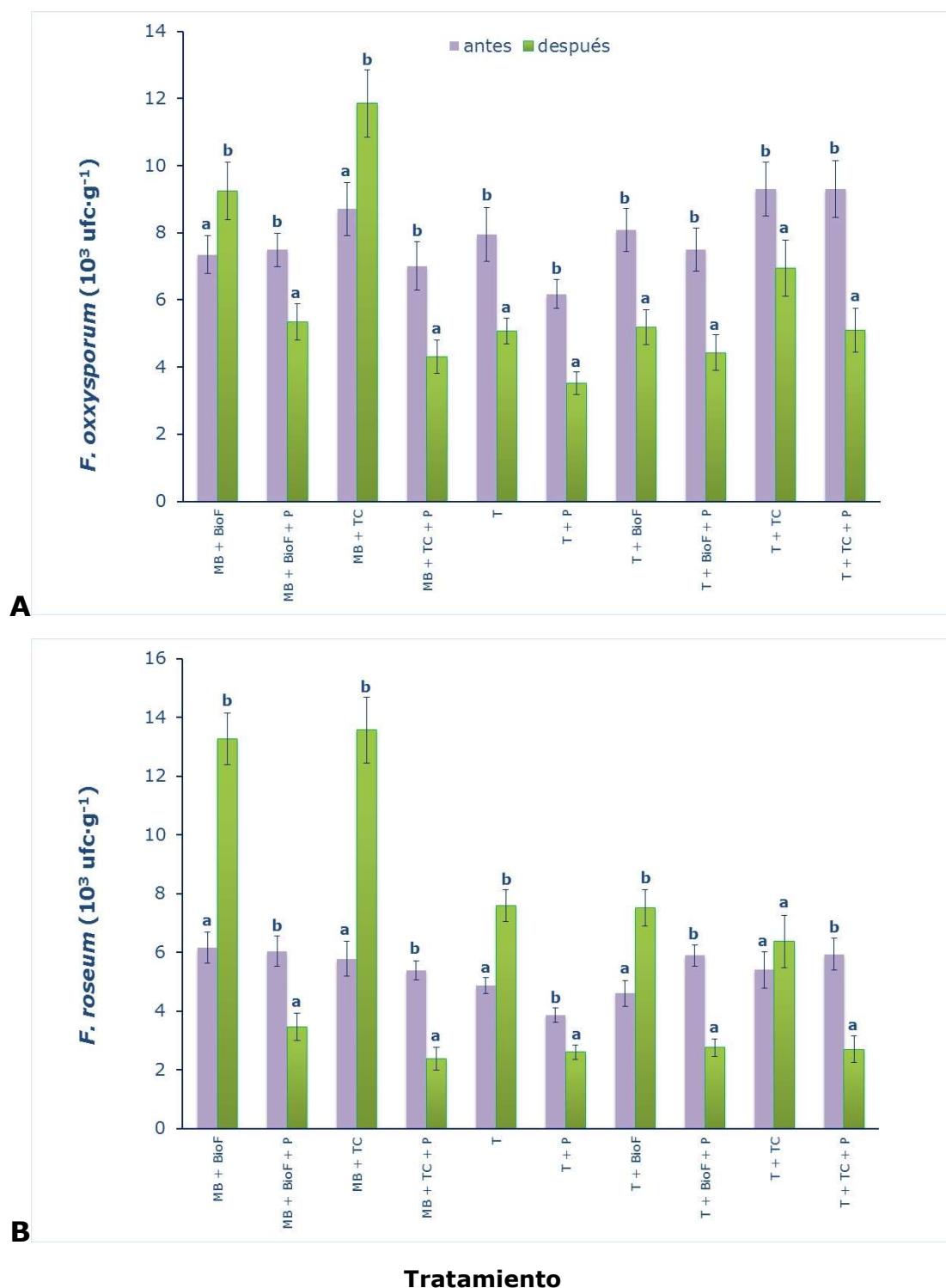
En las Figuras 3.26, y 3.27 se comparan las densidades de las especies fusáricas y el total de la población fusárica antes y después de aplicar los tratamientos de solarización, biofumigación y biosolarización en la primavera de 2012. Para cada especie de *Fusarium* y microbiota fusárica total y, a su vez, para cada uno de los tratamientos se realizó un ANOVA a una vía (fecha) para evaluar si existían diferencias significativas entre fechas. A continuación, cuando este efecto era significativo las fechas se compararon mediante el test (LSD) de Fisher.



**Tabla 3.34.** Densidad de la microbiota fusárica (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=16$ ) expresado en  $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup> suelo seco y porcentaje de cada especie para los diferentes tratamientos antes y después de aplicar los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización.

<b>ANTES</b>	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. roseum</i>		<i>F. solani</i>		TOTAL
Tratamiento	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>
MB + BioF	7,35 $\pm$ 2,24 abc	35,37	6,17 $\pm$ 2,13 c	29,68	7,27 $\pm$ 2,97	34,95	20,79 $\pm$ 5,53 bcd
MB + BioF + P	7,49 $\pm$ 2,00 ab	36,61	6,04 $\pm$ 2,04 c	29,52	6,93 $\pm$ 1,96	33,87	20,46 $\pm$ 4,01 bcd
MB + TC	8,71 $\pm$ 3,17 bc	38,33	5,78 $\pm$ 2,63 bc	25,41	8,25 $\pm$ 2,97	36,27	22,73 $\pm$ 5,89 d
MB + TC + P	7,01 $\pm$ 2,93 ab	36,36	5,39 $\pm$ 1,31 bc	27,97	6,88 $\pm$ 2,57	35,67	19,28 $\pm$ 4,41 abcd
T	7,94 $\pm$ 3,18 abc	41,84	4,87 $\pm$ 1,08 abc	25,69	6,16 $\pm$ 2,17	32,48	18,97 $\pm$ 4,40 ab
T + P	6,17 $\pm$ 1,71 a	37,20	3,86 $\pm$ 1,00 a	23,28	6,56 $\pm$ 1,54	39,52	16,59 $\pm$ 2,38 a
T + BioF	8,09 $\pm$ 2,55 bc	41,99	4,60 $\pm$ 1,81 ab	23,88	6,57 $\pm$ 2,17	34,12	19,27 $\pm$ 4,96 abc
T + BioF + P	7,49 $\pm$ 2,56 abc	35,36	5,89 $\pm$ 1,38 c	27,81	7,81 $\pm$ 2,85	36,83	21,19 $\pm$ 4,49 bcd
T + TC	9,30 $\pm$ 3,13 c	40,66	5,41 $\pm$ 2,39 bc	23,67	8,16 $\pm$ 3,04	35,68	22,87 $\pm$ 6,28 cd
T + TC + P	7,13 $\pm$ 2,82 c	42,14	5,94 $\pm$ 2,21 c	26,92	7,13 $\pm$ 2,57	30,94	20,41 $\pm$ 5,15 bcd
<b>DESPUÉS</b>	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. roseum</i>		<i>F. solani</i>		TOTAL
Tratamiento	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>	%	ufc·g <sup>-1</sup>
MB + BioF	9,25 $\pm$ 3,20 d	26,99	13,27 $\pm$ 3,31 c	38,71	11,76 $\pm$ 2,62 de	34,30	34,27 $\pm$ 4,30 e
MB + BioF + P	5,35 $\pm$ 2,00 bc	31,18	3,46 $\pm$ 1,75 a	20,16	8,35 $\pm$ 3,79 bc	48,67	17,16 $\pm$ 6,06 bcd
MB + TC	11,85 $\pm$ 3,76 e	31,85	13,57 $\pm$ 4,19 c	36,47	11,79 $\pm$ 4,29 de	31,68	37,20 $\pm$ 8,09 e
MB + TC + P	4,31 $\pm$ 1,99 ab	27,17	2,38 $\pm$ 1,52 a	15,02	9,17 $\pm$ 2,99 cd	57,81	15,87 $\pm$ 4,60 bc
T	5,07 $\pm$ 1,47 bc	27,01	7,59 $\pm$ 2,04 b	40,44	6,11 $\pm$ 1,44 ab	32,55	18,77 $\pm$ 3,03 cd
T + P	3,52 $\pm$ 1,37 a	29,68	2,60 $\pm$ 1,00 a	21,91	6,75 $\pm$ 1,97 a	48,40	11,87 $\pm$ 3,23 a
T + BioF	5,19 $\pm$ 2,08 bc	27,54	7,51 $\pm$ 2,49 b	39,88	6,13 $\pm$ 2,27 ab	32,58	18,83 $\pm$ 5,16 cd
T + BioF + P	4,43 $\pm$ 1,95 ab	30,18	2,76 $\pm$ 1,14 a	18,80	7,48 $\pm$ 1,74 abc	51,02	14,67 $\pm$ 3,89 ab
T + TC	6,94 $\pm$ 3,13 c	35,79	6,37 $\pm$ 3,34 b	32,83	6,09 $\pm$ 2,96 ab	31,39	19,39 $\pm$ 6,92 cd
T + TC + P	5,10 $\pm$ 2,55 ab	23,23	2,70 $\pm$ 1,75 a	12,28	14,16 $\pm$ 6,98 e	64,49	21,96 $\pm$ 9,56 d

MB: Mezcla Biofumigante; BioF: Biofence®; P: Plástico; TC: Torta de Colza; T: Testigo. Para la microbiota fusárica total y para cada especie de *Fusarium* los valores seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P>0,05$ ) entre los tratamientos, de acuerdo al test (LSD) de Fisher



**Figura 3.26.** Efecto de los tratamientos de solarización, biofumigación, biosolarización sobre la densidad (valor promedio  $\pm$  error estándar) de *F. oxysporum* (**A**) y *F. roseum* (**B**) expresada en  $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco antes y después de los tratamientos. Las barras seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test (LSD) de Fisher.

MB: Mezcla Biofumigante; BioF: Biofence®; P: Plástico; TC: Torta de Colza; T: Testigo.

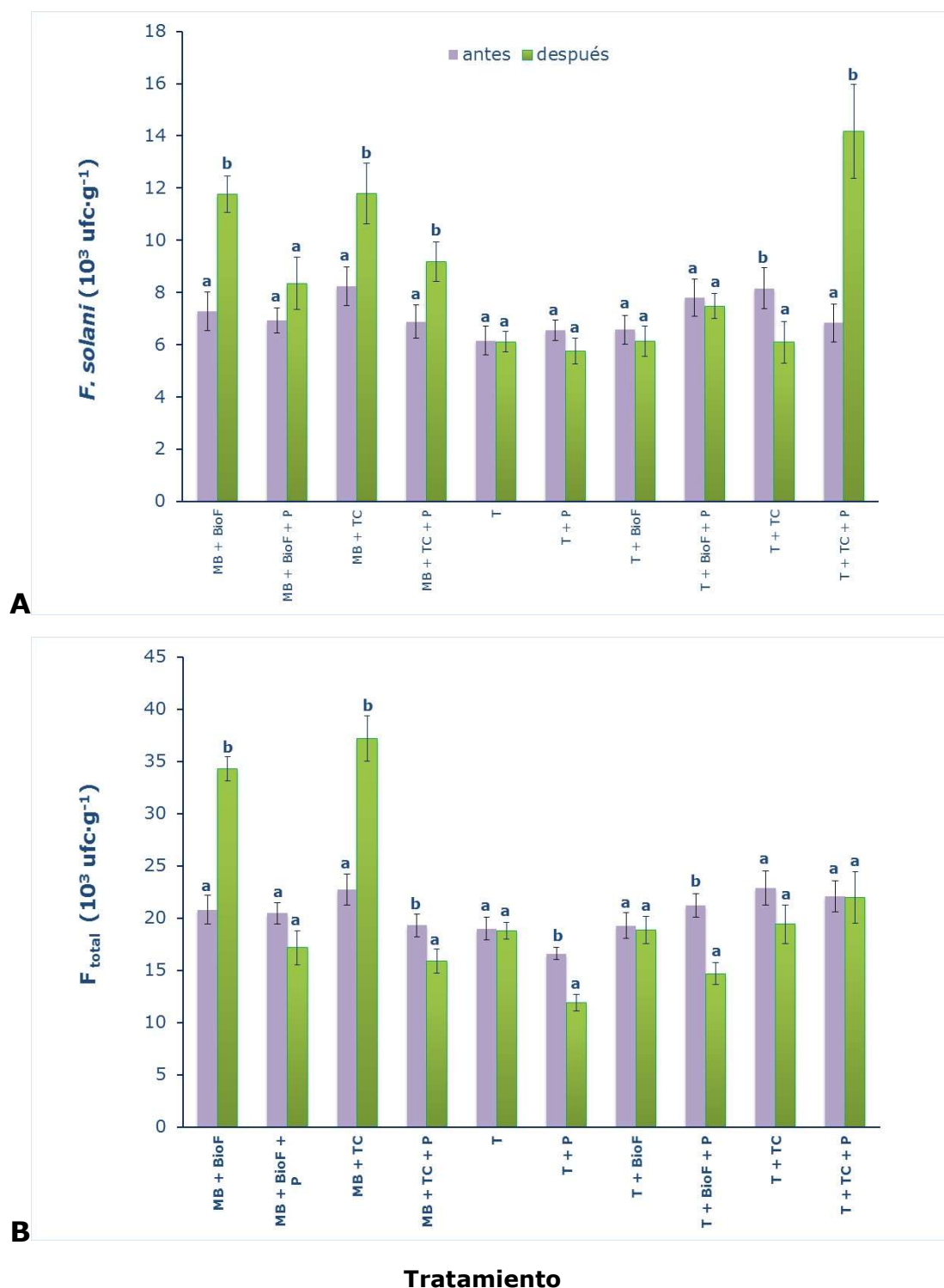
La aplicación de los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización influyeron en la composición de la población fusárica. Los cambios en las densidades de las tres especies fusáricas reflejan la diferente habilidad que estas poseen para competir por el espacio y los nutrientes (competencia intraespecífica) y/o diferente sensibilidad frente a los ITCs liberados por los materiales biofumigantes. Después de los tratamientos, *F. oxysporum* y *F. roseum* presentaron densidades similares y *F. solani* fue la especie más representada. Estos resultados coincidieron con los de Martínez *et al.* (2009), que observaron que *F. solani* fue la especie dominante después de la reiteración de tratamientos de biosolarización en invernaderos con cultivo de pimiento en el Campo de Cartagena.

La densidad de *F. oxysporum* fue reducida por todos los tratamientos, a excepción de los tratamientos MB + BioFence y MB + TC, que la incrementaron aproximadamente en un 26 % y 35 %, respectivamente. Por el contrario, el resto de tratamientos redujo significativamente la densidad de esta especie fusárica (Figura 3.26.A). En principio, este incremento podría estar motivado por la incorporación de la mezcla biofumigante ya que la adición de BioFence® y/o torta de colza no aumentaron la densidad de esta especie en los tratamientos equivalentes sin cultivo (T + BioF y T + TC). Stone y Hansen (1993) señalaron que los residuos de cubiertas vegetales proporcionan una fuente de alimento que estimula el crecimiento y reproducción de los hongos del suelo, como *Fusarium* y *Pythium* que pueden ser patógenos oportunistas.

En relación a la especie *F. roseum*, la aplicación del tratamiento T + TC no produjo cambios significativos en la densidad. Sin embargo, los tratamientos sin plástico incrementaron el número de propágulos por gramo de suelo: T, T + BioF, MB + BioF y MB + TC. Los dos últimos aumentaron la población en un 115 % y 135 %, respectivamente. El resto de tratamientos, con plástico, redujo significativamente la densidad de *F. roseum* (Figura 3.26.B). En este sentido, Njoroge *et al.* (2008) observaron mayores densidades de *F. oxysporum* en tratamientos de *B. napus* sin plástico que con plástico. El plástico pudo inducir

condiciones de anaerobiosis que disminuyeron la densidad de esta especie ya que *Fusarium* es un género de hongos aerobios, a pesar de que tienen una elevada tolerancia a las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Rodríguez-Molina, 1996). Los resultados del estudio de Blok *et al.* (2000) indicaron que en parcelas enmendadas con residuos de brócoli o césped y cubiertas con plástico se desarrollaron rápidamente condiciones de anaerobiosis y reducción, que redujeron significativamente la supervivencia de *F. oxysporum* f.sp. *asparagi*.

En la Figura 3.27.A se representan los cambios en la población de *F. solani* antes y después de los tratamientos. *F. solani* fue la especie más competitiva y/o resistente a los tratamientos ya que su densidad no mostró cambios significativos para varios tratamientos y solo el tratamiento T + TC redujo su densidad. Algunos tratamientos estimularon el desarrollo de *F. solani*, destacando el tratamiento T + TC + P que produjo un aumento de la densidad de esta especie en un 99 %.



**Figura 3.27.** Efecto de los tratamientos de solarización, biofumigación, biosolarización en la densidad (valor promedio  $\pm$  error estándar) de *F. solani* (**A**) y *F*<sub>total</sub> (**B**) expresada en  $10^3$  ufc·g<sup>-1</sup> de suelo seco antes y después de los tratamientos. Las barras seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ) de acuerdo al test (LSD) de Fisher.

MB: Mezcla Biofumigante; BioF: Biofence®; P: Plástico; TC: Torta de Colza; T: Testigo.

En relación a la población fusárica total, la respuesta fue variable ante la desinfección. Algunos tratamientos ensayados (MB + BioFence + P, T, T + BioFence, T + TC, T + TC + P) no mostraron diferencias de densidad antes y después de los tratamientos y solo los tratamientos MB + BioFence y MB + TC incrementaron significativamente la densidad final con respecto a la inicial (Figura 3.27.B). Este incremento pudo estar relacionado por la combinación del cultivo biofumigante y el uso de BioFence® y/o torta de colza. Smolinska y Kowalczyk (2014) reportaron que el uso de plantas desecadas o harina de semillas de las especies *B. juncea* o *B. nigra* estimuló significativamente la población de *Fusarium* en el suelo. Paudel y Carpenter-Boggs (2014) observaron un incremento de la población de *Fusarium* spp. al aplicar harina de semilla de *B. carinata*. Los tratamientos MB + TC + P, T + P y T + BioFence + P redujeron la densidad de la población fusárica total. Martínez *et al.* (2011) alcanzaron reducciones mayores del 72 % en la densidad de la microbiota fusárica total al aplicar reiteradamente tratamientos de biosolarización en dosis decrecientes (con o sin adición de residuos vegetales). Estos tratamientos son interesantes para el control de especies fusáricas fitopatógenas y mitigar la fatiga del suelo. *Fusarium* spp. tiene implicaciones en los efectos depresivos observados en las plantas de pimiento cultivadas en suelos donde se ha realizado monocultivo sostenido de esa hortaliza (Martínez *et al.*, 2009).

En conclusión, los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización generaron cambios cualitativos y cuantitativos en la microbiota fúngica. Por un lado, estos cambios pudieron estar relacionados con la disminución de la infectividad de *P. nicotianae* al aumentar la presencia de antagonistas, pese a la alta supervivencia del inóculo en el suelo. Por otro lado, al tener los hongos un papel importante en la degradación de la materia orgánica, estos pudieron: 1) incrementar la fertilidad del suelo, que se tradujo en un aumento de la producción del cultivo de pimiento; 2) mejorar las propiedades físicas, al favorecer la formación de agregados por la unión de las hifas del micelio a las partículas del suelo.

# Capítulo 4



## Discusión general





El objetivo del trabajo presentado en esta memoria de tesis era la búsqueda de nuevas técnicas para el control de hongos fitopatógenos del suelo, *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum*, causantes de la tristeza del pimiento y fusariosis vascular del tabaco, respectivamente.

Las prácticas agrarias asociadas al monocultivo y la producción intensiva durante muchos años han generado la proliferación de hongos fitopatógenos que ponen en riesgo las producciones. Además, a esta problemática hay que añadirle la prohibición de numerosos pesticidas, como el bromuro de metilo, para controlar estos hongos fitopatógenos del suelo.

Ante esta situación era necesaria la búsqueda de nuevas técnicas viables económicamente y respetuosas con el medio ambiente.

En la primera parte del trabajo se evaluaron en condiciones de laboratorio las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización para el control de los patógenos *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. Principalmente se hizo hincapié en la susceptibilidad de las especies fúngicas, la toxicidad de los materiales biofumigantes y la temperatura, con el objeto de conocer cuáles son condiciones idóneas para alcanzar una inactivación del 100 % del inóculo.

Por un lado, se estudió la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* por varias especies de *Brassicaceae* en fresco. Anteriormente, Sarwar *et al.* (1998) habían demostrado la toxicidad de ITCs puros en el crecimiento micelial de varios hongos como *Pythium irregulare* y *Fusarium graminearum*. Los ITCs que causaron mayor inhibición son productos de la hidrólisis de los GSLs presentes en los tejidos de especies de *Brassica*, sugiriendo el potencial de estas especies para el control de patógenos. Posteriormente, Morales-Rodríguez (2011) describió la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* por varias especies de *Brassicaceae* en verde. En este trabajo se evaluó el efecto de la parte subterránea (cuello y raíz) y la parte aérea (resto de la planta) de varias especies de *Brassicaceae* en la inhibición del crecimiento micelial de las dos especies fúngicas, con vistas a seleccionar aquellas especies

biofumigantes que causaran la mayor inhibición para ambas partes, para posteriormente ser utilizadas en el ensayo de campo.

Se observó que la parte subterránea de las especies biofumigantes ensayadas era más eficaz que la parte aérea en la inhibición de *P. nicotianae*, pero el orden de eficacia era el mismo para las dos partes de la planta. Sin embargo, para *F. oxysporum* no se observaron diferencias de inhibición entre las dos partes excepto para *B. oleracea*, cuya parte subterránea causó mayor inhibición.

Todas las especies biofumigantes ensayadas inhibían el crecimiento de las especies fúngicas, sin embargo, no todas eran igual de eficaces. Por otra parte, en condiciones de campo, no todas las especies germinaban igual y producían la misma cantidad de materia verde/seca al final del cultivo. Ante esta situación se optó por buscar nuevos materiales más estables, de fácil adquisición y que evitasen el cultivo de las brásicas, como los pellets de *B. carinata* (BioFence®) y torta de colza, cuya acción sería independiente de las condiciones agroclimáticas y fuesen más efectivas en el control de los patógenos.

Tanto los pellets como la torta de colza inhibieron a las dos especies fúngicas pero a dosis muy inferiores en comparación con las empleadas con el material fresco. Además, los aislados de *P. nicotianae* y *F. oxysporum* mostraron diferencias de sensibilidad a los compuestos liberados por los pellets y la torta de colza. Previamente ya había sido descrito la existencia de diferencias de inhibición entre aislados de *P. nicotianae* por el efecto biofumigante de distintas especies de *Brassicaceae* en fresco (Morales-Rodríguez *et al.*, 2010, 2012) y en forma de pellets (Morales-Rodríguez *et al.*, 2014; Serrano-Pérez *et al.*, 2017).

Cabe señalar que *P. nicotianae* se mostró más sensible que *F. oxysporum* a todos los materiales ensayados, posiblemente debido a las diferencias de composición de la pared celular y estructura de la membrana entre ambas especies (Bartnicki-Garcia, 1987). Los pellets de *B. carinata* fueron los materiales más eficaces en la inhibición del crecimiento micelar de *P. nicotianae* y *F.*

*oxysporum*. Estos resultados eran prometedores, en el sentido que su uso podría asegurar la inactivación del inóculo sin necesidad de cultivar las especies de *Brassicaceae*, y en consecuencia, se ahorrarían todos los costes derivados del cultivo. No obstante, había que demostrar el efecto de los pellets en condiciones de campo.

Por otro lado, era importante comprobar si los compuestos liberados por las especies de *Brassicaceae* (en fresco) eran capaces de inactivar los distintos tipos de inóculo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. Primero se demostró que las especies biofumigantes ensayadas en fresco inactivaron el inóculo de ambas especies fúngicas a temperaturas relativamente bajas (20 y 25 °C). Para *F. oxysporum* no se observaron diferencias de inactivación entre temperaturas salvo para *B. nigra* que presentó mayor inactivación a 25 °C. Sin embargo, el efecto fue mayor a 25 °C que a 20 °C para *P. nicotianae*, probablemente porque a esta temperatura la inactivación del inóculo pudo ser superior y, además, podría haberse liberado una mayor cantidad de compuestos volátiles.

En un segundo experimento se ensayaron las especies de *Brassicaceae* a temperaturas fluctuantes elevadas, medias y bajas simulando bajo condiciones de campo la biosolarización y biofumigación en Murcia y Extremadura. Las especies de *Brassicaceae* (en fresco) ensayadas a temperaturas fluctuantes elevadas o medias inactivaron totalmente las clamidosporas de *P. nicotianae*, excepto en el caso de *B. carinata*, que las inactivó parcialmente a temperaturas medias. Por el contrario, la inactivación de las clamidosporas de *P. nicotianae* fue baja cuando las especies de *Brassicaceae* se ensayaron a temperaturas fluctuantes bajas.

Igualmente, en los testigos no biofumigados se produjo una inactivación considerable del inóculo a temperaturas fluctuantes elevadas, pero no a las temperaturas medias o bajas.

De los resultados de este experimento se dedujo que la temperatura por sí sola produce una inactivación considerable del inóculo de *P. nicotianae* a temperaturas fluctuantes elevadas y la inactivación fue total cuando se combinó con especies de *Brassicaceae*. En concordancia con estos resultados, Lacasa *et al.* (2015) y Rodríguez-Molina *et al.* (2015) observaron reducciones de la densidad del inóculo de *P. nicotianae* al aplicar tratamientos de solarización en el suelo, además, la temperatura afecta a la volatilidad y a la concentración de los ITCs producidos durante la hidrólisis de los GSLs (Price *et al.*, 2005).

Un tercer ensayo corroboró el efecto exclusivo de la temperatura en la inactivación del inóculo de los testigos de *P. nicotianae* que fue significativamente mayor a 30 °C que a 25 °C. Con respecto a *F. oxysporum*, se observó inactivación del inóculo de los testigos pero no hubo diferencias significativas entre las dos temperaturas.

También se probó el efecto de los pellets de *B. carinata* (BioFence®) en la inactivación del inóculo-talco de *F. oxysporum* que fue significativamente mayor a 25 °C que a 30 °C. No obstante, resultados en la misma línea fueron obtenidos por Morales-Rodríguez *et al.* (2018) que concluyeron que los pellets de *B. carinata* presentaron una mayor eficacia a 10 °C que a 20 °C en la inhibición de la germinación de las conidias de *F. circinatum*. Por el contrario, la inactivación de *P. nicotianae*, en general, fue mayor a 30 °C que a 25 °C para los dos tipos de inóculo. Conviene subrayar que a pesar de que las clamidosporas son estructuras de resistencia, por lo general, fueron más susceptibles a los pellets que el triturado miceliar de *P. nicotianae* a 25 y 30 °C. Smolinska *et al.* (2013) observaron que el efecto de los ITCs fue más relevante en la germinación de conidias y clamidosporas que en la inhibición del crecimiento miceliar de *F. oxysporum*.

Asimismo, se observó que la efectividad de los pellets disminuyó con el tiempo de exposición (24 h, 48 h, 7 y 14 días) para *F. oxysporum* (25 y 30 °C) y *P. nicotianae* (25 °C). A los 14 días la inactivación fue mínima ya que la mayoría de los ITCs son liberados en las primeras horas después de hidratar los pellets

(De Nicola *et al.*, 2013; Lazzeri, 2014). En contraposición, la inactivación de *P. nicotianae* a 30 °C aumentó con el tiempo de exposición a los pellets.

De los ensayos de laboratorio se deduce que es necesario aplicar diferentes técnicas para el control efectivo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. La susceptibilidad de las estructuras fúngicas de ambas especies es diferente para los materiales biofumigantes ensayados y condiciones de temperatura. La temperatura es un factor clave para reducir la supervivencia del inóculo y garantizar el control eficaz de los patógenos. Igualmente, es fundamental elegir los materiales biofumigantes más eficaces para optimizar la aplicación de estas técnicas, destacando los pellets de *B. carinata* (BioFence®) por su acción en la inhibición del crecimiento micelial e inactivación del inóculo de las especies fúngicas a dosis muy bajas.

En la segunda parte del trabajo se evaluaron las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización para el control de *P. nicotianae* en condiciones de campo.

La tristeza del pimiento es una enfermedad considerada como un factor limitante del cultivo, siendo *P. nicotianae* su principal agente causal en Extremadura (Rodríguez-Molina *et al.*, 2010b). En la literatura científica existían artículos relativos al uso de estas técnicas en invernaderos de Murcia para el control de *Phytophthora spp.* en cultivos de pimiento para pimentón. Algunos autores mostraron la eficacia de estas técnicas, como Lacasa *et al.* (1999) que observaron que la biosolarización era eficaz para el control de la tristeza del pimiento durante los meses de julio y agosto. Guerrero *et al.* (2004a, 2004b) concluyeron que la reiteración de la biosolarización durante varios años había proporcionado niveles aceptables de control de *P. capsici* en invernaderos del Campo de Cartagena (Murcia). Además, se observaban cambios en las propiedades físicas y químicas del suelo (Fernández *et al.*, 2004) y mejoras de la producción de pimiento (Guerrero *et al.*, 2004a).

Estas mismas técnicas podrían ser válidas para controlar la tristeza del pimiento en Extremadura y mejorar las propiedades físico-químicas del suelo. Pero la puesta en práctica de estas novedosas técnicas en Extremadura exigía del estudio de estas bajo condiciones de campo para evaluar con detalle los pormenores de dichas técnicas, partiendo de los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio.

Por un lado, las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización tenían que ser compatibles con las condiciones agroclimáticas de Extremadura y, por otro lado, debían respetar el ciclo de cultivo (mayo-septiembre) de pimiento para pimentón en esta comunidad. Además, se quería comprobar si estas técnicas podrían mejorar las propiedades de los suelos para aumentar la producción de los cultivos.

Se eligió una parcela de la Finca "La Orden" (CICYTEX) situada en el término de Lobón, en las Vegas Bajas de Gadiana (Badajoz). El suelo de esta parcela era representativo de la zona, con unas características propias consecuencia de la intensa actividad agrícola y del manejo inadecuado del suelo. En general, el bajo contenido de materia orgánica provoca inestabilidad en los agregados del suelo que se traduce en un aumento de la compactación, encostramiento, reducción de la permeabilidad y sellado del suelo. Estos problemas dificultan la germinación y nascencia de plántulas, influyendo, por tanto, en la producción de los cultivos.

El ciclo del cultivo de pimiento para pimentón en Extremadura comienza con el trasplante de las plantas a mediados de mayo y finaliza en septiembre. El suelo está ocupado por el cultivo durante los meses más favorables para la biodesinfección (Guerrero *et al.*, 2004), por lo que había que desarrollar técnicas usando diferentes materiales biofumigantes y dosis compatibles con el cultivo de pimiento. Para ello, se establecieron ensayos con distintas especies de *Brassicaceae* que se sembraron en octubre y se incorporaron al suelo en el mes de marzo, en el que previamente se habían introducido las sondas biológicas y sondas de temperatura y humedad.

De la interpretación de los resultados de supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* de las dos primeras campañas se dedujo que bajo las condiciones ensayadas, las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización no proporcionaban un control eficaz del patógeno, independientemente de la profundidad de enterrado del inóculo. Por una parte, los cultivos no proporcionaron una cantidad suficiente de materia biofumigante debido a que los cultivos no se desarrollaron adecuadamente por las dificultades en la germinación y nascencia, las condiciones climáticas y las particularidades de cada especie de *Brassicaceae*. Por otra parte, el principal factor limitante de la eficacia de estas técnicas eran las bajas temperaturas alcanzadas en los meses de marzo y abril en Extremadura. De hecho, los resultados de los ensayos realizados en condiciones controladas coincidían con los obtenidos en el campo. El inóculo (clamidosporas) de *P. nicotianae* sobrevivía cuando era expuesto a varias especies biofumigantes en el régimen temperaturas fluctuantes bajas, correspondiente a las condiciones de biofumigación con especies de *Brassicaceae* en marzo al aire libre en Extremadura. Sin embargo, cuando el inóculo fue expuesto a especies biofumigantes bajo regímenes de temperaturas fluctuantes elevadas (correspondientes a condiciones de biosolarización con estiércol fresco de oveja en invernadero en Murcia en el mes de agosto) la inactivación fue total, solo hubo supervivencia del 11 % en el testigo. Las altas temperaturas juegan un papel muy importante en estas técnicas ya que acentúan el efecto de la biofumigación al aumentar la liberación de sustancias volátiles (Ploeg *et al.*, 2001).

Ante la falta de eficacia de los tratamientos hasta ahora ensayados en condiciones de campo, se decidió incorporar nuevos materiales biofumigantes, como la torta de colza, en el momento de la incorporación de las especies biofumigantes en verde. El objetivo era incrementar la concentración de compuestos tóxicos para compensar las bajas temperaturas, insuficientes para inactivar el inóculo de *P. nicotianae*. Además, con la adición de torta de colza al suelo se aprovechaba un subproducto generado por la extracción de biodiesel de las semillas de *B. napus* var. *oleifera* en la Finca La Orden. En la literatura

científica aparecían referencias sobre las propiedades de la harina de semilla de especies de *Brassicaceae*, para suprimir el crecimiento miceliar de varias especies fúngicas. Por ello, previamente al uso de la torta de colza en el campo se comprobó en condiciones controladas su efecto fungitóxico, observándose que inhibía el crecimiento miceliar de *P. nicotianae* pero a dosis inferiores a las utilizadas para las especies biofumigantes en verde.

En la tercera campaña, en el momento de incorporar los cultivos de *B. nigra* y *S. alba* se añadió torta de colza a razón de 7.000 y 14000 kg·ha<sup>-1</sup>. En comparación con otras campañas las temperaturas registradas fueron mayores y se redujo la supervivencia global, solo se detectó el inóculo de *P. nicotianae* en el 29 % de las muestras. Esta reducción pudo estar relacionada con el alcance de mayores temperaturas en todos los tratamientos por el uso del plástico y de la torta de colza, a excepción del testigo. El análisis mediante regresión logística indicó que la adición de torta de colza a los tratamientos testigos y posterior cubierta con plástico redujeron la supervivencia del inóculo de *P. nicotianae*, esta reducción fue mayor a la dosis de 14.000 kg·ha<sup>-1</sup> por una mayor liberación de compuestos tóxicos. Sin embargo, los valores de infectividad fueron similares a los de otras campañas.

A pesar de que se habían reducido los valores de supervivencia del inóculo, el control de *P. nicotianae* aún era insuficiente y necesario aplicar materiales que liberasen mayor cantidad de compuestos volátiles. En el País Vasco, varios autores habían mejorado la eficacia de la biofumigación añadiendo pellets de *B. carinata* en el momento de incorporar el cultivo en verde de *S. alba* cuando las temperaturas del suelo eran moderadas (Núñez-Zofío *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio la adición de pellets de *B. carinata* (BioFence®) no implicó mejoras en los resultados de supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae*.

En definitiva, la aplicación de las técnicas de solarización, biosolarización y biofumigación con especies de *Brassicaceae*, pellets de *B. carinata* (BioFence®) y torta de colza durante la primavera no consiguieron reducir el 100 % de la



supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* en condiciones de campo para ninguna de las campañas del estudio.

Cabe destacar la falta de correlación entre las variables supervivencia e infectividad. Tanto en la primera como en la última campaña, las variables supervivencia e infectividad no mostraron relación, la detección del inóculo en las muestras era muy alta frente a una baja infectividad. Esto podría deberse a que, por una parte, el método de detección de la presencia del inóculo fuera muy sensible y el número de propágulos fuese insuficiente para provocar enfermedad, y por otra parte, a que el suelo se comportase como supresivo al alterar la composición de la microbiota fúngica al aplicar los tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. La adición de materia orgánica en forma de enmienda actúa como fuente de energía y carbono para los microorganismos del suelo. Estos pueden controlar los patógenos edáficos, bien al degradar la materia orgánica produciendo compuestos tóxicos, bien a través de mecanismos antagonistas como competencia, antibiosis, parasitismo, predación, etc., (Janvier *et al.*, 2007).

En la última campaña del estudio se corroboró que al aplicar los tratamientos se generaron cambios cualitativos y cuantitativos en la microbiota fúngica que podrían explicar el comportamiento supresivo del suelo por el aumento de hongos antagonistas. Se redujo la densidad de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, en cambio, se incrementó la de los géneros *Rhizopus-Mucor*. También, se observaron cambios en la composición de la población fusárica, *Fusarium solani* fue la especie más representada después de los tratamientos mientras que *F. oxysporum* y *F. roseum* mostraron densidades similares. En particular, destacaron los tratamientos MB + TC y MB + BioF que presentan los mayores valores de densidad para todas las especies de *Fusarium* y población fusárica total. En este sentido, Smolinska y Kowalczyk (2014) y Paudel y Carpenter-Boggs (2014) reportaron un aumento de *Fusarium* spp. al aplicar harina de semillas de brásicas.

Por otra parte, la reiteración de técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización en rotación con los cultivos de pimiento, la adición de compost y la incorporación de los restos de vegetales de pimiento han reducido la densidad aparente del suelo. Varios autores explican este descenso por el aumento del espacio poroso al mezclar las enmiendas con el suelo. Por el contrario, la resistencia a la penetrabilidad del suelo no ha mejorado por la aplicación de tratamientos. La profundidad influye decisivamente en la resistencia a la penetrabilidad y conforme ha avanzado el estudio se han alcanzado valores más altos de resistencia a una menor profundidad. Además de la profundidad hay muchos otros factores que no fueron tenidos en cuenta en este estudio y que influyen en la resistencia a la penetrabilidad como el contenido de humedad del suelo, el contenido de materia orgánica, la heterogeneidad del suelo, etc.

Igualmente, la aplicación reiterada de tratamientos ha mejorado la fertilidad del suelo al aumentar los valores de los parámetros químicos del suelo: materia orgánica oxidable, conductividad eléctrica, pH, nitrógeno total, fósforo asimilable, potasio, calcio magnesio y sulfatos. Igualmente, Fernández *et al.* (2004) y Núñez-Zofío *et al.* (2012) observaron cambios en las propiedades químicas al aplicar biosolarización en los suelos de cultivo de pimiento en invernaderos de Murcia y País Vasco, respectivamente.

Por último, como consecuencia de la mejora de las propiedades físicas (densidad aparente) y químicas por la aplicación reiterada de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización se observó un incremento de la producción de pimiento para pimentón. Del mismo modo, los cambios en la microbiota fúngica generados por la adición de materia orgánica han podido favorecer una mejora de la fertilidad del suelo y, por tanto, un aumento de la producción del cultivo de pimiento. Núñez-Zofío *et al.* (2012) observaron un incremento en la producción de pimiento por la aplicación reiterada de tratamientos de biosolarización. No obstante, en este estudio no se encontraron diferencias de producción de pimiento entre los tratamientos aplicados para cada campaña salvo en la última. En la Campaña 2011-2012, en general, los

tratamientos que presentaron mayor producción de pimiento fueron aquellos en los que se incorporó torta de colza y BioFence®. Por el contrario, los tratamientos de menor producción fueron los tratamientos Testigo y Testigo + P. La torta de colza y los pellets (BioFence®) además de ser materiales biofumigantes constituyen una fuente de nutrientes esenciales que aumentan la producción de los cultivos.

En conclusión, esta memoria de tesis aporta datos relevantes sobre los factores de mayor influencia en la efectividad de las técnicas de biofumigación, biosolarización y solarización para el control de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*, como la temperatura y el tipo de biofumigante empleado que son claves para reducir la presencia del inóculo a niveles residuales. Aunque las técnicas aplicadas en campo no consiguieron un control eficaz del inóculo de *P. nicotianae*, se observaron mejoras en las propiedades físicas y químicas del suelo, así como un aumento de la producción de pimiento para pimentón.



# Capítulo 5



## Conclusiones



1. Los compuestos liberados por las especies de *Brassicaceae* en fresco, pellets (BioFence®) y torta de colza inhiben el crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. *P. nicotianae* se muestra más susceptible que *F. oxysporum* a todos los materiales biofumigantes ensayados.
2. La parte subterránea de las especies biofumigantes causa mayor inhibición del crecimiento micelial que la parte aérea en *P. nicotianae*. En *F. oxysporum* no hay diferencias de inhibición según la parte de la planta empleada, salvo en *B. oleracea*, cuya parte subterránea es la que causa mayor inhibición.
3. Los pellets de *B. carinata* (BioFence) se presentan como el material biofumigante más eficaz para el control del crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*.
4. Los aislados de las especies fúngicas mostraron diferencias de sensibilidad a los compuestos liberados por los pellets y la torta de colza.
5. Las especies de *Brassicaceae* (en fresco) ensayadas a 20 y 25 °C produjeron inactivación del inóculo de *P. nicotianae* y *F. oxysporum*. La inactivación fue mayor a 25 °C para *P. nicotianae* mientras que para *F. oxysporum* no se observaron diferencias entre temperaturas salvo para *B. nigra* que presenta mayor inactivación a 25 °C.
6. Las especies de *Brassicaceae* (en fresco) ensayadas a temperaturas fluctuantes elevadas o medias inactivan totalmente las clamidosporas de *P. nicotianae*, excepto en el caso de *B. carinata*, que las inactiva parcialmente a temperaturas medias. En los testigos no biofumigados se produce una inactivación considerable del inóculo a temperaturas fluctuantes elevadas, pero no a las temperaturas medias.
7. Las especies de *Brassicaceae* no logran niveles aceptables de inactivación de las clamidosporas de *P. nicotianae* cuando se ensayan a temperaturas fluctuantes bajas.

8. La supervivencia del inóculo (triturado y clamidosporas) de los testigos no biofumigados de *P. nicotianae* es significativamente menor a 30 °C que a 25 °C. Sin embargo, para el inóculo de los testigos de *F. oxysporum* no se han observado diferencias significativas de supervivencia entre 25 y 30 °C.
9. Los pellets ensayados a 25 y 30 °C producen inactivación del inóculo *F. oxysporum* (inóculo-talco) y de *P. nicotianae* (triturado miceliar y clamidosporas). La inactivación es significativamente mayor a 25 °C que a 30 °C para *F. oxysporum*. Por el contrario, la inactivación de *P. nicotianae*, en general, es mayor a 30 °C que a 25 °C para los dos tipos de inóculo.
10. Por lo general, el inóculo-clamidosporas de *P. nicotianae* es más susceptible a los pellets que el inóculo-triturado miceliar a 25 y 30 °C.
11. La inactivación del inóculo de *F. oxysporum* (a 25 y 30 °C) y *P. nicotianae* (a 25°C) desciende conforme aumenta el tiempo de exposición a los pellets. Por el contrario, la inactivación aumenta a mayor tiempo de exposición para el inóculo de *P. nicotianae* ensayado a 30 °C.
12. En condiciones de campo, la aplicación de las técnicas de solarización, biosolarización y biofumigación con especies de *Brassicaceae*, pellets de *B. carinata* (BioFence®) y torta de colza durante la primavera no consiguen reducir el 100 % de la supervivencia e infectividad del inóculo de *P. nicotianae* en ninguna de las campañas del estudio.
13. La supervivencia e infectividad de *P. nicotianae* es independiente de la profundidad del enterrado (15 o 30 cm) del inóculo en el suelo.
14. Generalmente las variables supervivencia e infectividad no están correlacionadas. Valores muy altos de supervivencia se corresponden con valores bajos de infectividad.



15. La reiteración de tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización en rotación con los cultivos de pimiento, la adición de compost y la incorporación de los restos de vegetales de pimiento han reducido la densidad aparente del suelo.
16. La resistencia a la penetrabilidad del suelo no ha mejorado por la aplicación de tratamientos. La profundidad influye decisivamente en la resistencia a la penetrabilidad y conforme ha avanzado el estudio se han alcanzado valores más altos de resistencia a una menor profundidad.
17. La aplicación reiterada de tratamientos ha aumentado los valores de los parámetros químicos: materia orgánica oxidable, conductividad eléctrica, pH, nitrógeno total, fósforo asimilable, potasio, calcio magnesio y sulfatos. Sin embargo, no se han observado cambios significativos para los valores de carbonatos y sodio entre las fechas iniciales y finales.
18. La producción de pimiento para pimentón se ha incrementado por la mejora de las propiedades físicas (densidad aparente), químicas y biológicas, consecuencia de la aplicación reiterada de tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización.
19. Se generaron cambios cualitativos y cuantitativos en la microbiota fúngica por la aplicación de tratamientos de biofumigación, biosolarización y solarización. Estos redujeron la densidad de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, en cambio, incrementaron la de los géneros *Rhizopus-Mucor*.
20. La composición de la población fusárica ha variado tras la aplicación de tratamientos, *Fusarium solani* es la especie más representada mientras que *F. oxysporum* y *F. roseum* muestran densidades similares.
21. En particular, los tratamientos MB + TC y MB + BioF presentan los mayores valores de densidad para todas las especies de *Fusarium* y población fusárica total.



# Capítulo 6



**Referencias  
bibliográficas**

- Adebola, M. O., Amadi, J. E., 2010. Antagonistic activities of *Paecilomyces* and *Rhizopus* species against the cocoa black pod pathogen (*Phytophthora palmivora*). *African Scientists* 11(4): 235 – 239.
- Agrios, G. N., 1988. *Plant Pathology*. 3<sup>rd</sup> Edición, Academic Press. New York. 803 pp.
- Agrios, G. N., 2005. *Plant Pathology*. Academic Press, New York, USA, 952 pp.
- Alabouvette, C., 1983. La receptivité des sols aux fusarioses vasculaires. Role de la compétition nutritive entre microorganismes. Thèse Doct. Univ. Nancy I, Nancy, 158 pp.
- Alabouvette, C., Couteaudier, Y., Louvet, J., 1984. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. IX. Dynamique des populations de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* dans un sol résistant et dans un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*, 4 (8): 729-733.
- Alfaro, A., Vegh, I., 1971. La "Tristeza" o "Seca" del pimiento producida por *Phytophthora capsici* Leonian. *Anales INIA, Serie Prot. Veg.*, 1: 9-42.
- Altieri, M. A., 1997. *Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable*, CLADES, La Habana, Cuba, 249 pp.
- Al-Turki, A., Dick, W., 2003. Myrosinase Activity in Soil. *SCI. Soc. Am. J.*, 67:139-145.
- Ambrósio, M. M. Q., Bueno, C. J., Padovani, C. R., Souza, N. L., 2009. Sobrevivência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, em microcosmo, simulando solarização com prévia incorporação de materiais orgânicos. *Summa Phytopathol., Botucatu*, v. 35, n. 1, p. 20-25.
- AFI (Analistas Financieros Internacionales), Confederación de Organizaciones Empresariales, Mesa del Tabaco., 2015. La importancia del sector del tabaco en la economía española. 84 pp.
- Analistas Financieros Internacionales, Mesa del Tabaco., 2017. La importancia del sector del tabaco en la economía española. 84 pp.
- Andrades, M., Martínez, M. E., 2014. Fertilidad del suelo y parámetros que la definen. Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones. Logroño. 29 pp.
- Andrés-Ares, J. L., Rivera Martínez, A., Fernández Paz, J., 2005. Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. *Span. J. Agric. Res.*, 3(4): 429-436.
- Angus, J. F., Gardner, P. A., Kirkegaard, J. A., Desmarchelier, J. M., 1994. Biofumigation: Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant Soil*, 162: 107-112.
- Ansani, C. V., Matsuoka, K., 1983. Infectividade e viabilidade de oósporos de *Phytophthora capsici* no solo. *Fitopatol. Bras.*, 8: 137-146.
- Antoniou, P. P., Tjamos, E. C., Giannakou, J. O., 2014. Low-cost and effective approaches of soil disinfestation of plastic houses or open field crops in Greece. *Acta Horticult.*, 1044: 29-42.
- Aoki, T., O'Donnell, K., 1998. *Fusarium* kyushuense sp. nov. from Japan. *Mycoscience*, 39 (1):1-6.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. M., 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology* 80(3):189-201.
- Aragón, A., García, M. G., Filguera, R. R., Pachepsky, Y. A., 2000. Maximum compactability of Argentine soils from the Proctor test: The relationship with organic carbon and water content. *Soil Till. Res.*, 56: 197-204.
- Armstrong, G. M., Armstrong, J. K., 1968. Formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* causing a tracheomycosis in the syndrome of disease. *Phytopathology*, 58:1242-6.
- Armstrong, G. M., Armstrong, J. K., 1981. Another approach to race classification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology*, 71:474-478.
- Arriaga, H., Núñez-Zofio, M., Larregla, S., Merino, P., 2011. Gaseous emissions from soil biodisinfestation by animal manure on a greenhouse pepper crop. *Crop Protection*, 30: 412-419.
- Assis, R. L., Lazarini, G. D., Lancas, K. P., Cargnelutti Filho, A., 2009. Avaliação da resistência do solo à penetração em diferentes solos com a variação do teor de água. *Engenharia Agrícola*, 29(4): 558-568.
- Aulakh, M. S., Khera, T. S., Doran, J. W., Kuldip-Singh, Bijay-Singh, 2000. Yields and nitrogen dynamics in a rice-wheat system using green manure and inorganic fertilizer. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64: 1867-1876.

- Avendaño-Prieto, B. L., Avendaño-Prieto, G., Cruz, W., Cárdenas-Avendaño, A., 2014. Guía de referencia para investigadores no expertos en el uso de estadística multivariada. *Perspect. Psicol.*, 10: 013-027.
- Aydi Ben Abdahall, R., Jabnoun-Khiareddine, H., Mokni-Tlili, S., Nefzi, A., Medimagh-Saidane, S., *et al.*, 2015. Endophytic *Baccillus* spp. from Wild Solanaceae and Their Antifungal Potential against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici Elucidated Using Whole Cells, Filtrate Cultures and Organic Extracts. *J. Plant Pathol. Microbiol.*, 6: 324.
- Azimzadeh, Y., Shirvani, M., Shariatmadari, H., 2016. Rhizosphere and green manure effects on soil chemical attributes and metal bioavailability as a function of the distance from plant roots in mono and mixed corn and canola cultures. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62 (8): 1066-1081.
- Baker, K. F., Cook, R. J., 1974. *Biological Control of Pathogens*. W.H. Freeman Company. San Francisco, U.S. 433p.
- Ballasote, M. J., Bejarano, J., Blanco, M. A., Jiménez-Díaz, R. M., Melero, J. M., 1994. La solarización del suelo: una estrategia para controlar enfermedades causadas por organismos de suelo y reducir las alternativas de cultivo. *Investigación Agraria: Fuera de serie*, 2: 207-212.
- Barbercheck M. E., Von Broembsen S. L., 1986. Effects of soil solarization on plant-parasitic nematodes and *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Plant Dis.*, 70: 945-950.
- Bartnicki-Garcia, S., 1969. Cell wall differentiation in the *Phycomycetes*. *Phytopathology*, 59:1065-1071.
- Bartnicki-Garcia, S., 1970. Cell wall composition and other biochemical markers in fungus phylogeny. 81-102 pp. En: *Phytochemical Phylogeny*. J. B. Harborne, ed. Academic Press, London.
- Bartnicki-Garcia, S., 1973. Cell wall genesis in a natural protoplast: The zoospore of *Phytophthora palmivora*. 77-91 pp. En: *Yeast, Mould, and Plant Protoplasts*. J. R. Villanueva, I. García-Acha, S. Gascón, y F. Uruburu, eds. Academic Press, London.
- Bartnicki-Garcia S., 1987. The cell wall - a crucial structure in fungal evolution. En: *Evolutionary Biology of the Fungi*. Eds. A.D.M. Rayner, C.M. Brasier and D. Moore. pp 390-403. Cambridge University Press, New York.
- Bartnicki-García, S., Wang, M. C., 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. 121-137 pp. En: *Phytophthora: It's Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-García and P. H. Tsao, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.
- Bartolomé-García, T. J., Velázquez Otero R., Gómez-Aguado Gutiérrez, M., 2006. El Sector Hortícola. En: *La Agricultura y la Ganadería Extremeña. Informe 2005 y Análisis de una Década: 1996-2005*. Ed. Caja de Ahorros de Badajoz. Indugrafic S.L., Badajoz.
- Bartolomé-García, T. J., Velázquez, R., Córdoba, M.G., Coletto, J. M., 2013. Avances en la mecanización del cultivo de pimiento para pimentón en la comarca de la Vera (Cáceres). En: *La Agricultura y la Ganadería Extremeña en 2012*. Fundación Caja Badajoz. Badajoz.
- Bartual, R., Marsal, J. I., Carbonel, E. A., Tello, J. C., Campos, T., 1991. Genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* Leon en pimiento. *Bol. San. Veg. Plagas*, 17: 3-124.
- Bell, C. H., Price, N., Chakrabarti, B., 1996. The methyl bromide issue. Bell C H, Price N, Chakrabarti B., (eds.) J. New York, N.Y: Wiley & Sons, 254 pp.
- Bello, A., Díez-Rojo, M. A., López-Cepero, J., López-Pérez, J. A., García-Álvarez, A., 2008. Principios ecológicos en la gestión de los agrosistemas. *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Sistema*, 729: 19-29.
- Bello, A., López-Pérez, J. A., Díaz-Virulinche, L., de León, L., Sanz, R., Escuer, M., 1999. Local resources as methyl bromide alternatives in nematodes control. Abstracts of the XXXI Annual Meeting ONTA, June 21-25, San Juan, Puerto Rico. *Nematropica* 29, 116.
- Bello, A., López-Pérez, J. A., Sanz, R., Escuer, M., Herrero, J., 2000. Biofumigation and organic amendments. Fregional Workshop on Methyl Bromide alternatives for North Africa and Southern European Countries, United Nations Environment Programme (UNEP), Francia, 113-141 pp.
- Bello A., López-Pérez J. A., García Álvarez A., 2003. Biofumigación en agricultura extensiva de regadío. Fundación Ruralcaja Alicante y Ediciones Mundi-Prensa, Alicante, 670.
- Bello, A., López-Pérez, J.A., García-Álvarez, A., Arcos, S.C., Ros, C., Guerrero, M.M., Guirao, P., Lacasa, A., 2004. Biofumigación con solarización para el control de los nematodos en cultivo de pimiento. En: Lacasa, A., Guerrero, M. M., Oncina, M., Mora, J. A., eds. *Desinfección de suelos en invernaderos de*

- pimiento. Publicaciones de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Jornadas 16: 129-207.
- Bellostas, N., Jørgensen, A. L. W., Lundin, N. V. F., Petersen, I. L., Sørensen, H., Sørensen, J. C. Sørensen, R., Tidmand, K. D., 2003. Comparison of physicochemical properties of myrosinase isoenzymes in seeds of *Brassica* species of the U triangle. En: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark, 720-723 pp.
- Bellostas, N., Sørensen, J. C., Sørensen, H., 2004. Qualitative and quantitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles. *Agroindustria*, 3:5-10.
- Bending, G. D., Turner, M. K., Rayns, F., Marx, M. C., Wood, M., 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11):1785-1792.
- Bennett, R. S., Spurgeon, D. W., DeTar, W. R., Gerik, J. S., Hutmacher, R. B., Hanson, B. D., 2011. Efficacy of four soil treatments against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 on cotton. *Plant. Dis.*, 95:967-976.
- Bergamin, A. C., Vitorino, A. C. T., Lempp, B., Souza, C. M. A., Souza, F. R., 2010. Anatomia radicular de milho em solo compactado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(3): 299-305.
- Berkenkamp, B., 1973. A growth-stage key for rape. *C. J. Plant Sci.* 53, 413.
- Bianchini, A., Maia, J. C. S., Magalhaes, P. S. G., Capellini, N., Umezu, C. K., 2002. Penetrógrafo eletrônico automático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 6(2): 332-336.
- Bernal, M. P., 2004. Fertilidad y contaminación de suelos agrícolas. Aplicación al cultivo de la vid. CSIC.
- Bimpong, C. E., Clerk, G. C., 1970. Motility and chemotaxis in zoospores of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. *Ann. Bot.*, 34: 617-624.
- Bjerg, B., Sørensen, H., 1987. Quantitative analysis of glucosinolates in oilseed rape based on HPLC of desulfoglucosinolates and HPLC of intact glucosinolates. En: Wathelet J. P. (ed.). *World Crops: Production, Utilization, Description. Glucosinolates in Rapeseeds: Analytical Aspects*.
- Bjergegaard, C. Li, P.W., Michaelsen, S., Møller, P., Otte, J., Sørensen, H., 1994. Glucosinolates and their transformation products – compounds with a broad biological activity. En: *Bioactive substances in Food of Plant Origin, Proceedings of the International Euro Food Tox IV Conference*, Olsztyn, Poland. Kozłowska, H., Fornal, J and Zdunczyk, Z. Eds.1: 1-15.
- Bjergegaard, C., Mortensen, K., Petersen, I. L., Sørensen, H., Sørensen, J. C., 2003. Isolation and characterization of myrosinase isoenzymes occurring in *Brassica napus* L. and *Sinapis alba* L. 712-715 pp. En: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark.
- Black, C. A., 1965. *Methods of soil analysis. Part I.* American Society of Agronomy, Madison. 790 pp.
- Blackwell, E., 1949. Terminology in *Phytophthora*. *Commonw. Mycol. Instit. Mycol. Pap.*, 30, 24 pp.
- Blake, G. R., Hartge, K. H., 1986. Bulk density. In: Klute, A., Ed., *Methods of Soil Analysis, Part 1—Physical and Mineralogical Methods*, 2nd Edition, Agronomy Monograph 9, American Society of Agronomy—Soil Science Society of America, Madison, 363-382.
- Blaya, J., Lacasa, C. M., Lacasa, A., Pascual, J. A., 2014. Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates in south-east Spain and their detection and quantification through a real-time TaqMan PCR. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1243-1251.
- Blok, W. J., Lamers, J. G., Termorshuizen, A. J., Bollen, G. J., 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology*, 90: 253-259.
- Blok, W. J., Bollen, G. J., 1995. Fungi on roots and stem bases of asparagus in the Netherlands: species and pathogenicity. *Eur. J. Plant Pathol.*, 101: 15-24.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., Scala, F., 2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *J. Plant Pathol.*, 89: 311-324.
- Booth, C., 1971. The genus *Fusarium*. *Commonwealth Mycol. Inst., Kew*, 237 pp.
- Booth, E. J., Walker, K. C., Griffiths, D. W., 1991. A time-course study of the effect of sulphur on glucosinolatos in oilseed rape (*Brassica napus*) from the vegetative stage to maturity. *J. Sci. Food Agric.*, 56: 479-493.



- Borek, V., Morra, M. J., Brown, P. D., McCafferey, J. P., 1995. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitril in soil. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1935-1940.
- Borrás, H., Pérez, M. C., Noriega, J., Felix, E., Martín, A., Rodríguez, Y., Mosqueda, M., 1997. Empleo de *Trichoderma* sp. en el control de la pudrición piña causada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* en segmentos de tallos. *Cuadernos de Fitopatología*, 54: 148-149.
- Bowen, H. D., 1981. Alleviating mechanical impedance. In: ARKIN, G. F., TAYLOR, H. M. Modifying the root environment to reduce crop stress. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers, p. 21-57.
- Bowers, J. H., Papavizas, G. C., Johnston, S. A., 1990. Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. *Plant Dis.*, 74: 771-777.
- Bradford, J. M., 1986. Penetrability. In: KLUTE, A. (ed.) *Methods of soil analysis: physical and mineralogical methods*, Madison: American Society of Agronomy, 463-478 pp.
- Bradshaw, J. E., Heaney, R. K., Macfarlane Smith, W. H., Gowers, S., Gemmell, D. J., Fenwick G. R., 1984. The glucosinolate content of some fodder *Brassicas*. *J. Sci. Food Agr.*, 35: 977-981.
- Brar, B. S., Singh, J., Singh, G., Kaur, G., 2015. Effects of Long Term Application of Inorganic and Organic Fertilizers on Soil Organic Carbon and Physical Properties in Maize-Wheat Rotation. *Agronomy*, 5: 220-238.
- Brown, P. D., Morra, M. J., 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate containing plants. *Adv. Agron.*, 61: 167-231.
- Bulluck, L. R., Brosius, M., Evanylo, G. K., Ristaino, J. B., 2002. Organic and synthetic fertility, amendments influence soil microbial, physical, and chemical properties on organic and conventional farms. *Appl. Soil Ecol.*, 19:147-160.
- Burgess, L. W., 1981. General ecology of the Fusaria, 225-235. In: P. E. Nelson, T. A. Tousson and R. J. Cook (eds.). *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State Univ. Press, Univ. Park and London, 457 pp.
- Burgess, B., Ummerell, S., Bullock, K., Gott y Backhouse, P., 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3<sup>rd</sup> ed. University of Sydney and Botanic Gardens, Department of Crop Sciences, Fusarium Research Laboratory, Sydney, Australia. 191 pp.
- Buskov, S., Hansen, L. B., Olsen, C. E., Sørensen, H., Sørensen, J. C., Sørensen, S., 2000. Determination of ascorbigens in autolysates of various *Brassica* species using supercritical fluid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2693-2701.
- Campbell, D. C., Kondra, Z. P., 1978. Relationships among growth patterns, yield components and yield of rapeseed. *Can. J. Plant Sci.*, 58: 87-93.
- Campbell, D. J, O'Sullivan, M. F., 1991. The cone penetrometer in relation to trafficability, compaction, and tillage. In: Smith, K. A., Mullins, C. E. *Soil analysis*. New York, Marcell Dekker, p.399-423.
- Cenis, J. L., Fuchs, P., 1988. Efecto comparado de la solarización y el metam sodio en un cultivo de pimiento en invernadero. *ITEA*, 75: 21-38.
- Chamorro, M., Miranda, L., Domínguez, P., Medina, J. J., Soria, C., Romero, F., López Aranda, J. M., De los Santos, B., 2015. Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry. *Crop Prot.*, 67: 279-286.
- Charan, C.S., Sams, S.E., 1999. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of *Brassica* species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 124: 462- 467.
- Chaudhari, P. R., Ahire, D. V., Ahire, V. D., Chkravarty, M., Maity, S., 2013. Soil Bulk Density as related to Soil Texture, Organic Matter Content and available total Nutrients of Coimbatore Soil. *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 3(2).
- Cheah, L-H., Marsh, A.T., Hedderley, D., Falloon, R. E., 2008. Crop rotation with Brassicas reduces *Phytophthora* populations in potato soil. *Arable & Vegetable Crops*. New Zealand Plant Protection, 61:256-260.
- Chellemi, D. O., Olson, S. M., Mitchell, D. J., 1994. Effects of soil solarization and fumigation on survival of soilborne pathogens of tomato in northern Florida. *Plant Disease*, 78: 1167-1172.

- Chellemi, D. O., Olson, S. M., Mitchell, D. J., Secker, I., McSorley, R., 1997. Adaptation of soil solarization to the integrated management of soilborne pests of tomato under humid conditions. *Phytopathology*, 87: 250-258.
- Chen, Y., Katan, J., 1980. Effect of solar heating of soils by transparent polyethylene mulching on their chemical properties. *Soil Sci.*, 130: 271-276.
- Chen, Y., Gamliel, A., Stapleton, J. J., Aviad, T., 1991. Chemical, physical, and microbial changes related to plant growth in disinfested soils. En: Katan, J., DeVay, J. E. (Eds.), *Soil Solarization*. CRC Press, Boca Raton (USA), 103-129.
- Chong, C., Bible, B., 1974. Variation in thiocyanate content of radish plants during ontogeny. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 99: 159-162.
- Clarkson, J., Debode, J., Furlan, L., Neilson, R., Wallenhammar, A. C., Zahrl, J., 2015. Mini-paper - Monitoring of soil-borne pathogens (fungi, protists and nematodes) and soil tests. Focus Group Soil-borne diseases.
- Clossais-Besnard, N., Larher, F., 1991. Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. *J. Sci. Food Agric.*, 56: 25-38.
- Coelho, L., Chellemi, D. O., Mitchell, D. J., 1999. Efficacy of soil solarization and cabbage amendment for the control of *Phytophthora* spp. in North Florida. *Plant Disease*, 83: 293-299.
- Coelho, L., Mitchell D. J., Chellemi, D. O., 2000. Thermal inactivation of *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology*, 90: 1089-1097.
- Coelho, L., Mitchell, D. J., Chellemi, D. O., 2001. The effect of soil moisture and cabbage amendment on the thermos inactivation of *Phytophthora nicotianae*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107: 883-894.
- Colla, P., Gilardi, G., Gullino, M. L., 2012. A review and critical analysis of the European situation of soilborne disease management in the vegetable sector. *Phytoparasitica* 40, 515-523.
- Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio, Junta Extremadura, 2017. Superficies agrícolas y producciones vegetales. En: *La Agricultura y la Ganadería Extremeña en 2017*. Fundación Caja Badajoz. Badajoz.
- Cook, R. J., Baker, K. F., 1983. *The Nature and Practise of Biological Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minn. 539 pp.
- Costantini, A., 1996. Relationships between cone penetration resistance, bulk density, and moisture content in uncultivated, repacked, and cultivated hardsetting and non-hardsetting soils from the coastal lowlands of South-East Queensland. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 26(3): 395-412.
- Couteadier, Y., 1989. Interactions microbiennes dans le sol et la rhizosphere: analyse du déterminisme de la compétition entre populations de *Fusarium*. Thèse Doct. Univ. Claude Bernard, Lyon I, Lyon, 101 pp.
- Cuadrado, I., Gómez, J., 1983. Observaciones sobre el estado sanitarios de los cultivos hortícolas en Almería. *Investigaciones sobre los cultivos hortícolas intensivos*. Boletín Informativo, 5: 53-88. INIA CRIDA 10.
- Cullman, S. W., Duxbury, J. M., Lauren, J. G., Thies, J. E., 2006. Microbial community response to soil solarization in Nepal's rice-wheat cropping system. *Soil Biol. Biochem.*, 38: 3359-3371. DOI:10.1016/j.soilbio.2006.04.053.
- Daugovish, O., Downer, J., Becker, O., Browne, G., Duniway, J., 2004. Mustard-derived biofumigation for vegetable crops and strawberries. *Agroindustria*, 3: 335-338.
- Davis, D., 1964. Host fungitoxicants in selective pathogenecity of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 54: 290-293.
- Davila, M., 1964. La enfermedad de la Tristeza del Pimiento. Boletín Informativo del Servicio de Plagas del Campo, 18: 10-11
- Daxenbichler, M. E., Spencer, G. F., Carlson, D. G., Rose, G. B., Brinker, A. M., Powell, R. G., 1991. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry*, 30: 2623-2638.
- De March, G., McGregor, D. I., Seguin-Shwartz, G., 1989. Glucosinolate content of maturing pods and seed of high and low glucosinolate summer rape. *Can. J. Plant Sci.*, 69: 929-932.



- De Nicola, G. R., D'Avino, L., Curto, G., Malaguti, L., Ugolini, L., Cinti, S., *et al.*, 2013. A new bio based liquid formulation with biofumigant and fertilising properties for drip irrigation distribution. *Ind. Crops Prod.*, 42: 113-118.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Prieto, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D., 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430.
- Dexter, A. R., Czyz, E. A., Gat, O. P., 2007. A method for prediction of soil penetration resistance. *Soil e Tillage Research*, 93(1): 412-419.
- Diana, G., Piccirillo, P., 1994. Avversità de lla coltura del tabacco: funghi. *Informatore Fitopatologico*, 1: 7-16.
- Dias Junior, M. S., Pierce, F. J., 1996. O processo de compactação do solo e sua modelagem. *R. Bras. Ci. Solo*, 20: 175-182.
- Díez-Rojo, M.A., 2010. Bases agronómicas para la utilización de restos agrarios en biodesinfección de suelos. Tesis doctoral. ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid, 327 pp.
- Doheny-Adams, T., Lilley, C. J., Barker, A., Ellis, S., Wade, R., Atkinson, H. J., Urwin, P. E., Redeker, K., Hartley, S. E., 2018. Constant Isothiocyanate-Release Potentials across Biofumigant Seeding Rates. *J. Agric. Food Chem.*, 66:5108-5116.
- Domínguez, P., Miranda, L., Soria, C., de los Santos, B., Chamorro, M., Romero, F., Daugovish, O., López-Aranda, J. M., Medina, J. J., 2014. Soil biosolarization for sustainable strawberry production. *Agron. Sustain. Dev.*, 34: 821-829.
- Drobnica, L., Zemanova, M., Nemec, P., Antos, K., Kristian, P., Stullerova, A., Knoppova V., Nemec, J. R. P., 1967. Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds. I. Naturally occurring isothiocyanates and their analogues. *Appl. Microbiol.*, 15: 701- 709.
- Dutta, B. K., Isaac, I., 1979. Effects of organic amendments to soil on the rhizosphere microflora of antirrhinum infected with *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant and soil*, 53: 99-103.
- El-Swaify, S. A., Dangler, E. W., 1982. Rainfall Erosion in the Tropics: A State-of-the-Art. In: *Soil Erosion and Conservation in the Tropics*. Madison, Wisconsin, 1982, pp: 1-26 (ASA Special Publication, 43).
- Ellouze, W., Taheri, A. E., Bainard, L. D., Yang, C., Bazghaleh, N., Navarro-Borrell, A., Hanson, K., Hamel, C., 2014. Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management. *Biomed Research International*, 2014: 531824. DOI: 10.1155/2014/531824.
- Erwin, D. C., 1983. Variability within and among species of *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. The American Phytopathol. Society, St. Paul, MN.
- Erwin, D. C., Ribeiro, O. K., 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS PRESS, St. Paul, Minnesota. 562 pp.
- Escuer, M., Cano, A., Bello, A., 2004. Nematodos fitoparásitos de la región de Murcia y alternativas de control. Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento. Segunda jornada sobre alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento de invernadero, Murcia, España, 27-57 pp.
- Espárrago, G., 1999. Nematodos en tabaco en Extremadura. En: *Temas de I+D Agrario en Extremadura*. Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura, Mérida. 271 pp.
- Espárrago, G., Blanco, I., 2002. First report of the Cyst Nematode (*Globodera tabacum*) Complex on flue-cured tobacco in Spain. *Plant Disease*, 86:1402.
- Espárrago Rodilla, G., Rodríguez-Molina, M. C., Verdejo Alonso, E., Palo Núñez, E., Blanco Martín, I., 2004. La Fusariosis Vascular del tabaco asociada a *Globodera tabacum* en el Valle del Tiétar (Extremadura). XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lloret de Mar (Gerona), 143 pp.
- Fahey, O. J. W., Zalcman, A. T., Talalay, P., 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56 (1): 5-51.
- Fang, X. L., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., Barbetti, M. J., 2011. Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect of temperature. *Sci. Hortic.* 131, 39-48.
- Fang, J. G., Tsao, P. H., 1995. Efficacy of *Penicillium funiculosum* as a biological control agent against *Phytophthora* root rots of azalea and citrus. *Phytopathology*, 85: 871-878.

- Fatima, K., Nouredine, K., Henni, J. E., Mabrouk, K., 2015. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Phytophthora infestans* In the North-West of Algeria. International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 6(4):44-53.
- Fayzalla, E. A., El-Barougy, E., El-Rayes, M. M., 2009. Control of Soil-Borne Pathogenic Fungi of Soybean by Biofumigation with Mustard Seed Meal. Journal of Applied Sciences, 9(12):2272-2279.
- Fenwick, G. R., Heaney, R. K., Mullin, W. J., 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut., 18: 123-201.
- Fernández, L., 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Editorial Semarnat. México, pp. 117-128.
- Fernández, P., Guerrero, M., Ros, C., Bello, A., García, A., Lacasa, A., 2004. Efecto de la biofumigación+solarización sobre la características físicas y químicas de los suelos de pimiento del Sureste español. Actas de Horticultura, 42: 6-12.
- Fieldsend, J., Milford, G. F. J., 1994. Changes in glucosinolatos during crop development in single and double low genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus*): production and distribution in vegetative tissues and developing pods during development and potential role in the recycling of sulphur within the crop. Ann. Appl. Biol., 124: 531-542.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Fortin, J. A., 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. New Phytol., 141: 525-533.
- Freeman, S., Katan, J., 1988. Weaking effect on propagules of *Fusarium* by sublethal heating. Phytopathology, 78: 1656-1661.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1993. The state of food and agriculture. FAO Agriculture Series, 26. Rome (Italy), 328 pp.
- Forsythe, W., 1985. Física de Suelos. IICA. San José, Costa Rica, 212 pp.
- Franzén, L., Hjelmroos, M., Kallbeg, P., Brorström-Lundén, E., Juntto, S., Savolainen, A., 1994. The yellow snow episode of northern Fennoscandia, March 1991. A case study of long distance transport of soil, pollen and stable organic compounds. Atmos Environ, 28(2): 3587-3604.
- Gale, E.S., Hemphill, D. D., Myhre, E. A., Bary, A. I., Sullivan, D. M., Cogger, C. G., 2006. Estimating plant-available nitrogen release from manures, composts, and specialty products. J. Environ. Qual., 35: 2321-2332.
- Gamliel, A., Austeraweil, M., Kritzman, M., 2000. Non-chemical approach to soilborne pest management - organic amendments. Crop Protection, 19: 847-853.
- Gamliel, A., Katan, J., 1991. Involvement of fluorescent pseudomonads and the other microorganisms, increased growth response of plants in solarized soils. Phytopathology, 81:494-502.
- Gambiel, A., Katan, J., 1993. Suppression of major and minor pathogens by fluorescent pseudomonads in solarized and nonsolarized soils. Phytopathology 83: 68-75.
- Gamliel, A., Stapleton, J. J., 1993. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. Phytopathology, 83: 899-905.
- Garbeva, P., van Veen, J. A., van Elsas, J. D., 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annual Reviews of Phytopathology, 42: 243-270.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A., Cacco, G., Van Elsas, J. D., 1999. Assesment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods, 38: 1-15.
- George, E., Marschner, H., Jakobsen, I., 1995. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Uptake of Phosphorus and Nitrogen From Soil. Critical Reviews in Biotechnology, 15: 3-4,257-270.
- Gilardi, G., Demarchi, S., Gullino, M. L., Garibaldi, A., 2014. Managing *Phytophthora* crown and root rot on tomato by pre-plant treatments with biocontrol agents, resistance inducers, organic and mineral fertilizers under nursery conditions. Phytopathologia Mediterranea, 53 (2): 205-2015.
- Gilardi, G., Pugliese, M., Gullino, M. L., Garibaldi, A., 2016. Effect of different organic amendments on lettuce *Fusarium* wilt and on selected soilborne microorganisms. Plant Pathol., 65: 704-712.
- Goode, P. M., 1956. Infection of strawberry roots by zoospores of *Phytophthora fragarie*. Trans. Br. Mycol. Soc., 39: 367-377.

- Greenberger, A., Yogeve, A., Katan, J., 1987. Induced suppressiveness in solarized soils. *Phytopathology*, 77: 1663-1667.
- Greenhalgh, J. R., Mitchell, N. D., 1976. The involvement of flavour volatiles in the resistance to downy mildew of wild and cultivated forms of *Brassica oleracea*. *New Phytol.*, 77: 391-398.
- Grob, K., Matile, P. H., 1979. Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells. *Plant Sci. Lett.*, 14: 327-335.
- Guerrero, M. M., 2012. Biosolarización de invernaderos para cultivos de pimiento: manejo de patógenos y fatiga del suelo. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena. 201 pp.
- Guerrero-Díaz, M. M., Lacasa-Martínez, C. M., Hernández-Piñera, A., Martínez-Alarcón, V., Lacasa-Plasencia, A., 2013. Evaluation of repeated biodisinfestation using *Brassica carinata* pellets to control *Meloidogyne incognita* in protected pepper crops. *Journal of Agricultural Research*, 11(2): 485-493.
- Guerrero, M. M., Ros, C.; Martínez, M.A., Barceló, N., Martínez, M. C., Guirao, P., Bello, A., Contreras, J., Lacasa, A., 2004a. Estabilidad en la eficacia desinfectante de la biofumigación con solarización en cultivos de pimiento. *Actas de Horticultura*, 42: 20-32.
- Guerrero, M. M., Ros, C., Guirao, P., Martínez, M. A., Martínez, M. C., Barceló, N., Bello, A., Lacasa, A., López, J. A., 2004b. Biofumigation plus solarisation efficacy for soil disinfection in sweet pepper greenhouses in the Southeast of Spain. *Acta Horticulturae*.
- Gullino, M. L., 2000. Status of methyl bromide alternatives for soil fumigation in Southern Europe. In: Methyl bromide alternatives for North African and Southern European countries. Eds. UNEP, pp. 87-92.
- Gulser, C., Candemir, F., 2012. Changes in penetration resistance of a clay field with organic waste applications. *Eurasian J. Soil Sci.*, 1: 16-21.
- Gupta, R. C., Tandon, R. N., 1978. *Mucor circinelloides* a destructive hyperparasite of *Rhizopus nigricans*. *Mycopathologia*, 64 (2):125-127.
- Guzmán, J. L., 2010. El tabaco ante el plan de apoyo de 2010. En: La Agricultura y la Ganadería Extremeña. Informe 2009. Ed. Caja de Ahorros de Badajoz. Indugrafic S. L., Badajoz.
- Guzmán-Casado, G., González de Molina, M., Sevilla-Guzmán, E., 1999. Introducción a la Agroecología como desarrollo rural sostenible. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Guzmán, J. L., Coletto, J. M., Pulido, F., Rodríguez, J. A., 2003. La producción de tabaco en las zonas rurales de Extremadura y su contribución al desarrollo sostenible. Ed. Cultivadores de Tabaco en España. (<http://www.cultivadoresdetabaco.com>).
- Handiseni, M., Brown, J., Zemetra, R., Mazzola, M., 2011. Herbicidal activity of *Brassicaceae* seed meal on wild oat (*Avena fatua*), Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*), redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology*, 25: 127-134.
- Hansen, Z. R., Keinath, A. P., 2013. Increased pepper yields following incorporation of biofumigation cover crops and the effects on soilborne pathogen populations and pepper diseases. *Applied Soil Ecology*, 63: 67-77.
- Hati, K., Swarup, A., Singh, D., Misra, A., Ghosh, P., 2006. Long-term continuous cropping, fertilisation, and manuring effects on physical properties and organic carbon content of a sandy loam soil. *Soil Res.*, 44: 487-495.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., Pegler, D. N., 1995. Dictionary of the fungi. CAB International. Wallingford.
- Haynes, R., Naidu, R., 1998. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: A review. *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 51: 123-137.
- Hemmes, D. E., 1983. Cytology of *Phytophthora*. Pp. 9-40. En: *Phytophthora*. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology (ed. Erwin, D. C., Bartnicki- García, S. y Tsao, P. H.): 139-147. American Phytopathol. Society. St. Paul, Minnesota.
- Hemmes, D. E., Wong, L. D. S., 1975. Ultrastructure of chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* during development and germination. *Can. J. Bot.*, 53:2945-2957.
- Henríquez, C., Cabalceta, G., 1999. Guía práctica para el estudio introductorio de los suelos con un enfoque agrícola. San José, Costa Rica Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo, 112 pp.

- Hernández, A., 2011. Efecto de la biosolarización con pellets de *Brassica carinata* y estiércol fresco de ovino sobre la capacidad infectiva y sobre la viabilidad de oosporas de *Phytophthora capsici*. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena. 41 pp.
- Hill, J., Lethenborg, P., Li, P. W., Rahman, M. H., Sørensen, H., Sørensen, J. C., 2003. Inheritance of progoitrin and total aliphatic glucosinolates in oilseed rape (*B. napus* L.). *Euphytica*, 134: 179-187.
- Höglund, A., Lenman, M., Rask, L., 1992. Myrosinase is localized to the interior of myrosin grains and is not associated to the surrounding tonoplast membrane. *Plant Sci.*, 85: 165-170.
- Hoitink, H. A., 1988. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24: 93-114.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Kubota, M., Koyama, H., Hyakumachi, M., 2007. The Plant Growth-Promoting Fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 Induces Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Activation of Multiple Defense Signals. *Plant Cell Physiol.*, 48(12): 1724-1736.
- Hossain, S., Bergkvist, G., Berglund, K., Glinwood, R., Kabouw, P., Martensson, A., Persson, P., 2014. Concentration- and Time-Dependent Effects of Isothiocyanates Produced from *Brassicaceae* Shoot Tissues on the Pea Root Rot Pathogen *Aphanomyces euteiches*. *J. Agric. Food Chem.*, 62 (20): 4584-4591.
- Hourichi, S., Hori, M., Takashi, S., Shimuzu, K., 1982. Factors responsible for the development of clubroot-suppressing effect in soil solarisation. *Bull. Chugoku Nat. Agric Exp. Stn.* E20, 25.
- Hwang, J., Benson, D. M., 2005. Identification, mefenoxam sensitivity, and compatibility type of *Phytophthora* spp. attacking floriculture crops in North Carolina. *Plant Dis.*, 89:185-190.
- Ibáñez, J. J., Bello, A., García-Alvárez, A., 2005. La conservación de los suelos europeos. Un análisis crítico de la actual estrategia de la Unión Europea. En: Callalba, A., Iribarren, I., Fernández Canteli, P. (eds.) Protección del suelo y el desarrollo sostenible. Publicaciones del IGME, MEC, Madrid. Serie Medio Ambiente 6, 133-161.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C., 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 1-23.
- Jeffers, S. N., Martin, S. B., 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.*, 70: 1038-1043.
- Ji, P., Kone, D., Yin, J., Jackson, K. L., Csinos, A. S., 2012. Soil amendments with *Brassica* cover crops for management of *Phytophthora* blight on squash. *Pest Management Science*, 68(4): 639-644.
- Jiménez, J., González, A., Lázaro, F., 1976. Estudio edafológico de la Finca "La Orden". Departamento Regional de Ecología. Centro de Extremadura. INIA. 146 pp.
- Jiménez-Díaz, R. M., Castillo Castillo, P., Navas Cortés, J. A., 2004. Muestreo, cuantificación y caracterización patogénica de hongos y nematodos fitopatógenos en el suelo: implicaciones para el control de enfermedades. 15º Symposium Internacional sobre la Evaluación del riesgo de plagas y enfermedades. El muestreo como herramienta esencial en la Protección Integrada. Phytoma España, 164:138-142.
- Jiménez-Fernández, D., 2011. Estudio de la interacción de *Fusarium* spp. con cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba. 248 pp.
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., López-Malo, A., 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 4- 2 (2010): 14-23.
- Juárez-Palacios, C., Félix-Gastelum, R., Wakerman, R. J., Paplomatas, E. J., DeVay, J. E., 1991. Thermal sensitivity of three species of *Phytophthora* and the effect of soil solarization on their survival. *Plant Dis.*, 75: 1160-1164.
- Kannan, H., Raviv, M., Medina, S. H., Krassnovsky, A., Minz, D., 2014. The effect of solar disinfestation and compost maturation level on soil microbial activity and eradication of *Macrophomina phaseolina* and *Verticillium dahliae*. *Acta Horticult.*, 1044: 149-156.
- Katan, J., 1980. Solar pasteurization of soils for disease control: Status and prospects. *Plant Dis.*, 64: 450-454.

- Katan, J., 1981. Solar heating (solarization) of soil control of soilborne pests. *Annual Reviews of Phytopathology*, 19: 211-236.
- Katan, J., 2005. Soil disinfestation: One minute before Methyl Bromide phase out. *Proceedures of VI<sup>th</sup> International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation. Acta Horticulturae*, 698: 19-25.
- Katan, J., DeVay, J. E., 1991. Soil solarization: historical perspective, principles and uses. En: Katan, J., DeVay, J.E. (Eds.), *Soil Solarization*. CRC press, Boca de Ratón (USA), 23-37.
- Katan, J., Greenberger, A., Alon, H., Grinstein, A., 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soilborne pathogens. *Phytopathology*, 66: 683-688.
- Kay, B. D., da Silva, A. P., Baldock, J. A., 1997. Sensitivity of soil structure to changes in organic carbon content: Predictions using pedotransfer functions. *Can. J. Soil Sci.*, 77: 655-667.
- Keinath, A.P., 1996. Soil amendment with cabbage residue and crop rotation to reduce gummy stem blight and increase growth and yield of watermelon. *Plant Dis.*, 80: 564-570.
- Kim, K., Prezzi, M., Salgado, R., Lee, W., 2008. Effect of Penetration Rate on Cone Penetration Resistance in Saturated Clayey Soils. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 134(8): 1142-1153.
- Kirkegaard, J. A., Gardner, J., Desmarchelier, J. M., Angus, J. F., 1993. Biofumigation using *Brassica* species to control pest and diseases in horticulture and agriculture. En: N. Wraether; R. J. Mailes (Eds). *Proc. 9<sup>th</sup> Australian Research Assembly on Brassicas* (Wagga Wagga), 77-82.
- Kirkegaard, J. A., Howe, G. N., Mele, P. M., 1999. Enhanced accumulation of mineral-N following canola. *Aust. J. Exp. Agric.*, 39: 587-93.
- Kirkegaard, J. A., Matthiessen, J. N., 2004. Developing and refining the biofumigation concept. *Proceedings 1<sup>st</sup> International Symposium on Biofumigation*, 31 March-1 April, 2004. Florence, Italy.
- Kirkegaard, J. A., Sarwar, M., 1998. Biofumigation potential of brassicas. I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant Soil*, 201:71-89.
- Kirkegaard, J. A., Wong, P. T., Desmarchelier, J. M., 1996. In vitro suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathol.*, 45: 593-603.
- Kjær, A., 1960. Naturally derived isothiocyanates (mustards oils) and their parent glucosinolates. 122-176 pp. En: Hetz W., Griesbach H., Kirby G. W. (Eds.). *Progress in the chemistry of organic natural products*. Springer-Verlag, Berlin, New York.
- Komada, H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soils. *Review of Plant Protection Research*, 8: 114-125.
- Kucke, M., 1993. The efficiency of rapeseed oil cake as fertilizer. *Agribiol. Res.*, 43: 269-276.
- Kruger, D. H. M., Fourie, J., Malan, A. P., 2013. Cover Crops with Biofumigation Properties for the Suppression of Plant-Parasitic Nematodes: A review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 34 (2): 287-295.
- Kushad, M. M., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Juvil, J. A., Klein, B. P., Walling, M. A., Jeffery, E. H., 1999. Variation of Glucosinolates in Vegetable Crops of *Brassica oleracea*. *J. Agric. Food Chem*, 47(4), pp 1541-1548.
- Labrador, J., 2008. El compostaje y su uso en agricultura. *Vida rural*, 273:34-40.
- Lacasa, C.M., Martínez, V., Hernández, A., Ros, C., Lacasa, A., del Mar Guerrero, M., *et al.*, 2015. Survival reduction of *Phytophthora capsici* oospores and *P. nicotianae* chlamydospores with *Brassica* green manures combined with solarization. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 197, 607-618.
- Lacasa, A., Guirao, P., Guerrero, M. M., Ros, C., López-Pérez, J. A., Bello, A., Bielza, P., 1999. Alternatives to methyl bromide for sweet pepper cultivation in plastic-greenhouses in southeast Spain. *International Workshop Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries. Proceedings. Heraklion, Creta (Grecia)*, del 7 al 10 de diciembre de 1999. Ed. European Commission, 2001: 133-135.
- Lacasa, C.M., Martínez, V., Martínez, M.C., Lacasa, A., Tello, J., 2013. *Phytophthora* en los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena (Murcia). *Agroecología*, 12: 18-19.
- LaMondia, J. A., 1992. Predisposition of broadleaf tobacco to *Fusarium* wilt by early infection with *Globodera tabacum* or *Meloidogyne hapla*. *Journal of Nematology*, 24 (3): 425-431.



- LaMondia, J. A., 2015. Fusarium wilt of tobacco. *Crop Protection*, 73: 73-77.
- LaMondia, J. A., 1995. Influence of resistant tobacco and tobacco cyst nematodes on root infection and secondary inoculums of *Fusarium oxysporum* f. sp. *nicotianae*. *Plant Disease*, 79: 337-340.
- LaMondia, J. A., Taylor, G. S., 1987. Influence of the tobacco cyst nematode (*Globodera tabacum*) on Fusarium wilt of Connecticut broadleaf tobacco. *Plant Disease*, 71: 1129-1132.
- Lamour, K. H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O. P., Schmutz, J., Kuo, A., et al., 2012. Genome Sequencing and Mapping Reveal Loss of Heterozygosity as a Mechanism for Rapid Adaptation in the Vegetable Pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10):1350-1360.
- Landis, T. D., Campbell, S. J., 1990. Soil fumigation in bareroot tree nurseries. Proceedings, IUFRO Working Party S2.07.09, Diseases and Insects in Forest Nurseries, Victoria, B. C. Canada, August 1990.
- Larkin, R. P., Griffin, T. S., 2007. Control of soilborne potato diseases using *Brassica* green manures. *Crop Protection*, 26: 1067-1077.
- Larregla, S., 2003. Etiología y epidemiología de la "Tristeza" del pimiento en Bizkaia. Su control. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco. Leioa, 756 pp.
- Laurence, M. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., Liew, E. C. Y., 2014. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology*, 118 (4):374-384.
- Lazzeri, L., 2014. Biofumigant plants and materials provide new field application techniques. En: 5th 17 International Symposium of Biofumigation, Harper Adams. University (UK). Disponible en: <http://www.harper-adams.ac.uk/events/biofumigation-conference/media.cfm>.
- Lazzeri, L., Baruzzi, G., Malaguti, L., Antoniacchi, L., 2003. Replacing methyl bromide in annual strawberry production with glucosinolate-containing green manure crops. *Pest Manage. Sci.*, 59: 983-990.
- Lazzeri, L., Leoni, O., De Nicola, G., Cinti, S., Malaguti, L., Curto, G. et al., 2008. Use of seed flour as soil pesticide. European Patent EP1530421B1.
- Lazzeri, L., Leoni, O., Manici, L. M., 2004. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products*, 20: 59-65.
- Lee, Y. H., Ahn, B. K., Lee, J. H., 2010. Effects of Rice Straw Application and Green Manuring on Selected Soil Physical Properties and Microbial Biomass Carbon in No-Till Paddy Field. *Korean J. Soil Sci. Fert.*, 43(1): 105-112.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A., 2006. The *Fusarium* Laboratory manual. (Blackwell Publishing: Iowa, USA).
- Letey, J., 1985. Relationship between soil physical properties and crop production. *Advances In Soil Sciences*, 1(1): 277-293.
- Li, C., Fultz, L. M., Moore-Kucera, J., Acosta-Martínez, V., Horita, J., Strauss, R., Zak, J., Calderón, F., Weindorf, D., 2017. Soil carbon sequestration potential in semi-arid grassland in the Conservation Reserve Program. *Geoderma*, 294: 80-90.
- Lira-Saldívar, R. H., Cruz, J., Beltrán, F., Jiménez, F., 2004. Effect of biofumigation with solarization and *Larrea tridentata* extract on soil-borne pathogens of pepper plants. *Biological Agriculture and Horticulture*, 22: 21-29.
- Liu, X. J. A., van Groenigen, K. J., Dijkstra, P., Hungate, B. A., 2017. Increased plant uptake of native soil nitrogen following fertilizer addition – not a priming effect? *Applied Soil Ecology*, 114: 105-110.
- Llera, F., 2011. Evaluación agronómica de suelos. Escuela de Administración Pública. Junta de Extremadura. 67 pp.
- Lombardo, S., Longo, A. M. G., Lo Monaco, A., Mauromicale, G., 2012. The effect of soil solarization and fumigation on pests and yields in greenhouse tomatoes. *Crop Protection*, 37: 59-64.
- López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Nunes, J. M. R., Peña, D., Cabrera, D., 2011. Cumulative and residual effects of two-phase olive mil waste on olive grove production and soil properties. *Soil Science Society of America Journal*, 75: 1061-1069.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., Donnell, K. O., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Kazan, K., 2013. *Fusarium* pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiol.* 67:399-416.

- Malajczuk, N., 1983. Microbial antagonism to Phytophthora. In 'Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology' (D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, eds.), pp. 197-218. American Phytopathological Society, St. Paul, M.N.
- Manici, L. M., Lazzeri, L., Palmieri, S., 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. J. Agric. Food Chem. 45: 2768-2773.
- MAPA, 1994. Métodos oficiales de análisis. T.III. Secretaria General Técnica, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Estadísticas agrarias/Superficies y producciones anuales de cultivos. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- Mari, M., Iori, R., Leont, O., y Marchi, A., 1993. In vitro activity of glucosinolate derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. Ann. Appl. Biol., 123: 155- 164.
- Marín-Guirao J. I., 2016. Evaluación del efecto de distintas materias orgánicas sobre la microbiota edáfica, contenido de nitratos en suelo, y producción y calidad de cultivos de tomate y sandía en suelo arenado bajo plástico. Tesis Doctoral. Universidad de Almería. 164 pp.
- Martin, J. K., 1977. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots. Soil Biol. Biochem., 9: 1-7.
- Martinez, A. E., 1999. Estudio ecológico de los hongos del suelo de un bosque de *Pinus taeda*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. 262 pp.
- Martínez, M. A., Lacasa, A., Tello, J., 2009. Ecología de la microbiota fúngica de los suelos de los invernaderos de pimiento y su interés agronómico. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Madrid, 374 pp.
- Martínez, M. A., Martínez, M. C., Bielza, P., Tello, J., Lacasa, A., 2011. Effect of biofumigation with manure amendments and repeated biosolarization on *Fusarium* densities in pepper crops. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 38: 3-11.
- Martínez, V., Ros, C., Guerrero, M. M., Lacasa, C. M., Fernández, P., Beltrán, C., Cano, A., Lacasa, A., 2010. Uso de brásicas verdes y pellets de *Brassica carinata* para la desinfección de suelos de pimiento. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena.
- Matthiessen, J. N., Shackleton, M. A., 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. Pest Manage. Sci., 61: 1043-1051.
- Mattner, S. W., Porter, I. J., Gounder, R. K., Shanks, A. L., Wren, D. J., Allen, D., 2008. Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens and weeds of strawberry. Crop Protection 27, 1165-1173.
- Mauromicale, G., Lo Monaco, A., Longo, A. M. G., Restuccia, A., 2005. Soil solarization, a non-chemical method to control branched broomrape (*Orobanche ramosa*) and improve the yield of greenhouse tomato. Weed Sci., 53: 877-883.
- Mauromicale, G., Lo Monaco, A., Longo, A. M. G., 2010. Improved efficiency of soil solarization for growth and yield of greenhouse tomatoes. Agron. Sustain. Dev., 30: 753-761.
- Mayea, S., Novo, R., Valiño, A., 1982. Introducción a la Microbiología del suelo. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba. 187 pp.
- Mayton, H. S., Olivier, C., Vaughn, S. F., Loria, R., 1996. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. Phytopathology, 86: 267-271.
- Mazzola, M., 2011. Potential of biofumigation for soilborne pest control in strawberry. pp 47.1-47.2. In: Proceedings Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. MBAO, Fresno, CA.
- Mazzola, M., Brown, J., Izzo, A. D., Cohen, M. F., 2007. Mechanism of action and efficacy of seed meal-induced pathogen suppression differ in a *Brassicaceae* species and time-dependent manner. Phytopathology, 97: 454-460.
- Mazzola, M., Granatstein, D. M., Elfving, D. C., Mullinix, K., 2001. Suppression of specific apple root by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. Phytopathology, 91: 673-679.

- Mazzola, M., Zhao, X., 2010. *Brassica juncea* seed meal particle size influences chemistry but not soil biology-based suppression of individual agents inciting apple replant disease. *Plant Soil*, 337: 313-342.
- Mbagwun, J. S. C., 1992. Improving the productivity of a degraded ultisol in Nigeria using organic and inorganic amendments. Part 2. Changes in physical properties. *Bioresource Technology*, 42: 167-175.
- McGuire, A., 2003. Mustard Green Manure. Bulletin EB1952E. Washington Estate University Extension.
- Medina-Mínguez, J. J., Miranda, L., Domínguez, P., Soria, C., Pérez-Jiménez, R. M., Zea, T., Talavera, M., Velasco, L., Romero, F., De los Santos, B., López-Aranda, J. M., 2012. Comparison of different chemical and non-chemical alternatives to Methyl Bromide for strawberry in Huelva (Spain). *Journal of Berry Research*, 2: 113-121.
- Messiaen, C. M., Cassini, R., 1968. Recherches sur les fusarioses. IV. La systématique des *Fusarium*. *Ann. Éiphyt.*, 19: 387-454.
- Miller, P. M., 1955. V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45:461-462.
- Minuto, A., Gilardi, G., Pomè, A., Garibaldi, A., Gullino, M. L., 2000. Chemical and physical alternatives to methyl bromide for soil disinfestation: results against soilborne diseases of protected vegetable crops. *J. Plant Pathol.*, 82: 179-186.
- Mircetich, S. M., Zentmeyer, A., Kendrick, J. B. Jr., 1968. Physiology of germination of chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 58: 666-671.
- Mitchell, D. J., Kannwischer-Mitchell, M. E., 1983. Relationship of inoculum density of *Phytophthora* species to disease incidence in various hosts in *Phytophthora*: In: *Phytophthora*. 259-269. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. / eds. U. Gisi D. C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia, and P.H. 'ikao St. Paul. Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Mitchell, D. J., Kannwischer-Mitchell, M. E., 1992. *Phytophthora* (31-38 pp). In: Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. L.L. Singleton, J.D. Mihail and C.M. Rush (eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Mithen, R. F., Lewis, B. G., 1986. In vitro activity of glucosinolates and their products against *Leptosphaeria maculans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 87: 433-440.
- Mithen, R., 1992. Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica*, 63: 71-83.
- Mitidieri, M., Brambilla, V., Saliva, V., Piris, E., Piris, M., Celié, R., Pereyra, K., Del Pardo, K., Chaves, E., González, J., 2009. Efecto de distintas secuencias de tratamientos de biofumigación sobre parámetros fisicoquímicos y biológicos del suelo, el rendimiento y la salinidad de cultivos de tomate y lechuga bajo cubierta. *Horticultura Argentina*, 28 (67): 5-17.
- Molin, J. P., Magalhaes, R. P., Faulin, G. D. C., 2006. Análise espacial da ocorrência do índice de cone em área sob semeadura direta e sua relação com fatores do solo. *Engenharia Agrícola*, 26(2): 442-452.
- Momma, N., Yamamoto, K., Simandi, P., Shishido, M., 2006. Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation (BSD). *J. Gen. Plant Pathol.*, 72: 247-252.
- Moorman, G. W., Kim, S. H., 2004. Species of *Pythium* from greenhouses in Pennsylvania exhibit resistance to propamocarb and mefenoxam. *Plant Dis.*, 88: 630-632.
- Moraes, M. T., Debiasi, H., Carlesso, R., Franchini, J. C., Silva, V. R., 2014. Critical limits of soil penetration resistance in a rhodic Eutrudox. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 38(1): 288-298.
- Moraes, M. T., Debiasi, H., Franchini, J. C., Silva, V. R., 2012. Correction of resistance to penetration by pedofunctions and a reference soil water content. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36(6): 1704-1713.
- Morales-Rodríguez, M. C., 2011. Caracterización fenotípica y molecular de *Phytophthora nicotianae* (Breda de Haan, 1896) de cultivos de pimiento y tomate de Extremadura. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. Badajoz, 220 pp.
- Morales-Rodríguez, M. C., Palo, C., Palo, E., Rodríguez-Molina, M. C., 2014. Control of *Phytophthora nicotianae* with Mefenoxam, Fresh *Brassica* Tissues, and *Brassica* Pellets. *Plant Disease*, 98: 77-83



- Morales-Rodríguez, M. C., Picón-Toro, J., Palo, C., Palo, E. J., García, A., Rodríguez-Molina, M. C., 2012. In vitro inhibition of mycelial growth of *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan from different hosts by *Brassicaceae* species. Effect of the developmental stage of the biofumigant plants. *Pest Management Science*, 68: 1317-1322.
- Morales-Rodríguez, M. C., Rodríguez-Molina, M. C., Picón-Toro, J., Palo Osorio, C., Palo Núñez, E. J., Duarte Maya, M. S., 2010. Inhibition of the mycelial growth of *Phytophthora nicotianae* by *Brassica* species. Abstracts of 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress, Lisboa, 22-27 August 2010. S14.250 (pp 662).
- Morales-Rodríguez, M. C., Vettraino, C., Vanini, A., 2016. Efficacy of Biofumigation with *Brassica carinata* Commercial Pellets (BioFence) to control Vegetative and Reproductive Structures of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Dis.*, 100: 324-330.
- Morra, M. J., Kirkegaard, J. A., 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. *Soil Biol. Biochem.*, 34: 1683-1690.
- Mujdeci, M., Isildar, A. A., Uygur, V., Alaboz, P., Unlu, H., Senol, H., 2017. Cooperative effects of field traffic and organic matter treatments on some compaction-related soil properties. *Solid Earth*, 8(1): 189.
- Munnecke, D. E., 1984. Establishment of microorganisms in fumigated avocado soil to attempt to prevent reinvasion of the soils by *Phytophthora cinnamomi*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83, 287.
- Muramoto, J., Shennan, C., Zavatta, M., Baird, G., Toyama, L., Mazzola, M., 2016. Effect of Anaerobic Soil Disinfestation and Mustard Seed Meal for Control of Charcoal Rot in California Strawberries. *International Journal of Fruit Science*, 16 (S1): 59-70.
- Nash, S. M., Snyder, W. C., 1965. Quantitative and qualitative comparasions of *Fusarium* populations in cultivated fields and noncultivated parent soils. *Can. J. Bot.*, 43: 939-945.
- National Academy of Sciences, 1980. Desarrollo y control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. 223 pp.
- Navas, A., Castagnone-Sereno, P., Blázquez, J., Espárrago, G., 2001. Population diversity and genetic structure of *Meloidogyne* on tobacco in a local región. *Nematology*, 3: 243-253.
- Njoroge, S. M. C., Riley, M. B., Keinath, A. P., 2008. Effect of incorporation of *Brassica* spp. Residues on population densities of soilborne microorganisms and on damping -off and Fusarium wilt of watermelon. *Plant Disease*, 92: 287-294.
- Nelson, P. E., 1990. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*, 27-35. In: R. C. Ploetz (ed.), *Fusarium wilt of banana*. APS Press, Minesota, 140 pp.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, M. M., 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State Univ. Press, Univ. Park and London, 193 pp.
- Newhook, F. J., Waterhouse G. M., Stamps D. J., 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England*. 143 pp.
- Nicoletti, R., De Stefano, M., De Stefano, S., Trincone, A., Marziano, F., 2004. Identification of fungitoxic metabolites produced by some *Penicillium* isolates antagonistic to *Rhizoctonia solani*. *Mycopathologia*, 158: 465-474.
- Noveriza, R., Quimio, T. H., 2004. Soil mycoflora of black pepper rhizosphere in the Philippines and their in vitro antagonism against *Phytophthora capsici* L. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 5(1): 1-10.
- Novoa, R., Martinez, M., Letelier, E., 1991. Comparación de un sistema de fertilización mineral con uno de fertilización orgánica, en una rotación trigo-fréjol. *Agricultura Técnica (Chile)*, 51:1-8.
- Núñez-Zofío, M., 2011. Evaluación de la biodesinfección para el control de *Phytophthora capsici* en cultivo de pimienta en invernadero. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco, 305 pp.
- Núñez-Zofío, M., Larregla S, Garbisu C., 2011. Application of organic amendments followed by soil plastic mulching reduces the incidence of *Phytophthora capsici* in pepper crops under temperate climate. *Crop Protection*, 30: 1563-1572.
- Núñez-Zofío, M., Larregla, S., Garbisu, C., 2012. Repeated biodesinfección controls the incidence of *Phytophthora* root and crown rot of pepper while improving soil quality. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10 (3), 794-805.

- O'Donnell, A., G., Seasman, M., Macrae, A., Waite, I., Davies, J., T., 2001. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant Soil*, 232: 135– 145.
- Odum, E., 1972. *Ecología*. Editorial Interamericana. México.
- OITAB (Organización Interprofesional del Tabaco de España), 2018. <https://www.hoy.es/agro/extremadura-produce-tabaco-20180529003358-ntvo.html>
- Ok, Y. S., Usman, A. R. A., Lee, S. S., Abd El-Azeem, S. A. M., Choi, B., Hashimoto, Y., Yang, J. E., 2011. Effects of rapeseed residue on lead and cadmium availability and uptake by rice plants in heavy metal contaminated paddy soil. *Chemosphere*, 85:677-682.
- Oka, Y. 2010. Mechanisms of nematodes suppression by organic soil amendments. A review. *Applied soil ecology*, 44: 101-115.
- Otto, R. Silva, A. P., Franco, H. C. J., Oliveira, E. C. A.; Trivelin, P. C. O., 2011. High soil penetration resistance reduces sugarcane root system development. *Soil and Tillage Research*, 117: 201–210.
- Pabin, J., Lipiec, J., Wlodek, S., Biskupski, A., Kaus, A., 1998. Critical soil bulk density and strength for pea seedling root growth as related to other soil factors. *Soil & Tillage Research*, 46: 203-208.
- Palazón, C., 1988. Estudio de los posibles métodos de control de la "Tristeza" o "Seca" del pimiento. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, 231 pp.
- Palazón, C., Palazón, I., 1989. Estudios epidemiológicos sobre la "Tristeza" del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. *Bol. San. Veg. Plagas*, 15: 233-262.
- Palmieri, S., Rollin, P., Sørensen, H., Sørensen, S., 1998. Enzyme technology for a potential glucosinolate utilization in Agro-Industry. *Agro Food Ind. High Tech.*, 9 (1): 24-27.
- Panabières, F., Ali, G. S., Allagui, M. B., Dalio, R. J., Gudmestad, N. C., Kuhn, M. L., Zampounis, A., 2016. *Phytophthora nicotianae* diseases worldwide: new knowledge of a long-recognised pathogen. *Phytopathol. Mediterr.*, 55 (1): 20.
- Patkowska, E., Konopinski, M., 2014. Antagonistic bacteria in the soil after cover crops cultivation. *Plant Soil Environ.*, 60(2): 69-73.
- Paudel, B.R., Carpenter-Boggs, L. A., 2014. Biofumigation Potential of *Brassica* Soil Amendments in Douglas-fir Seedlings. In: Wilkinson KM, Haase DL, Pinto JR, technical coordinators. National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations—2013. Fort Collins (CO): USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Proceedings RMRS-P-72. 29-34.
- Peña, D., 2013. Aprovechamiento de residuos de almazaras en suelos de olivar y de las Vegas del Guadiana: efectos en la dinámica de los herbicidas MCPA, S- metacloro y metribuzina. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura, 312 pp.
- Pereira-Jiménez, C., Aranda-Medina, E., Córdoba-Ramos, M. G., Bartolomé-García, T. J., 2011. Estudio del papel antioxidante del pimentón de la Vera. En: *La agricultura y la ganadería extremeñas: Informe 2010*, 165-178. Ed. Caja de Ahorros de Badajoz. Indugrafic S.L., Badajoz.
- Pérez, M., 2011. Epidemiología y control de *Phytophthora parasitica* en cultivos de tomate y pimiento bajo abrigo en el Sureste Peninsular de España. Tesis Doctoral. Universidad de Almería. Almería, 249 pp.
- Pérez, G. M., 2014. Cuantificación de la microbiota fúngica y bacteriana en el suelo arenado de un cultivo bajo plástico en Almería. Proyecto Monográfico. I.T.A. Industrias Agrarias y Alimentarias. Universidad de Almería. Almería, 149 pp.
- Pérez, A., Martín, E., Giménez, M., Fernández, M., Gómez, J., 2014. Eficacia de la solarización y la biosolarización del suelo en el control de patógenos en cultivos enarenados. *Vida Rural* nº 378. 24-30.
- Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C., 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biol Biochem*, 38:460–470.
- Picón-Toro, J., 2011. "El efecto biofumigante de especies de la familia *Brassicaceae* en hongos fitopatógenos". Trabajo Fin de Máster. Universidad de Extremadura. Badajoz, 89 pp.
- Picón-Toro, J., Morales-Rodríguez, M. C., Palo, C., Palo, E.J., García-Gallego, A., Rodríguez-Molina, M. C., 2012a. Influencia de la temperatura en el efecto biofumigante de especies de *Brassicaceae*: Inactivación *in vitro* de *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum*. XVI Congreso Sociedad Española de Fitopatología, Málaga. Resúmenes: 234.

- Picón-Toro, J., Morales-Rodríguez, M. C., Palo, C., Palo, E.J., García-Gallego, A., Rodríguez-Molina, M. C., 2012b. Inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum* por especies de *Brassicaceae*. XVI Congreso Sociedad Española de Fitopatología, Málaga. Resúmenes: 235.
- Ping, C. L., Jastrow, J. D., Jorgenson, M. T., Michaelson, G. J., Shur, Y. L., 2005. Permafrost soils and carbon cycling. *Soil*, 1: 147-171.
- Ploeg, A. T., 2000. Effects of amending soil with *Tagetes patula* cv. Single gold on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. *Nematology* 2, 489-493.
- Ploeg, A. T., Riverside, U. C., Stapleton, J. J., 2001. The effects of temperature, time, and amendment of soil with broccoli residues on the infestation of melon (*Cucumis melo* L.) by two root- knot nematode species. UC Plant Protection Quarterly. Online: [www.uckac.edu/ppq](http://www.uckac.edu/ppq).
- Pocock, K., Heaney, R. K., Wilkinson, A. P., Beaumont, J. E., Vaughan, J. G., Fewick, G. R., 1987. Changes in myrosinase activity and isoenzyme pattern, glucosinolate content and the cytology of myrosin cells in the leaves of heads of three cultivars of English white cabbage. *J. Sci. Food Agric.*, 41: 245-257.
- Ponchet, J., Ricci, P., Andreoli, C., Augé, G., 1972. Méthodes sélectives d'isolement du *Phytophthora nicotianae* f. sp. *parasitica* (Dastur) Waterh. á partir du sol. *Ann Phytopathol.*, 4: 97-108.
- Porta, J., López-Acevedo, M., Roquero, C., 1999. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi-Prensa. 2ª Edición, 917 pp.
- Potgieter, C., 2012. Assessment of the biofumigation effect of Canola (*Brassica napus*) on soil microbial community function and structure. Master of Science in Environmental Sciences at the Potchefstroom.
- Price, A. J., Charron, C. S., Saxton, A. M., Sams, C. E., 2005. Allyl isothiocyanate and carbon dioxide produced during degradation of *Brassica juncea* tissue in different soil conditions. *Hortscience*, 40: 1734-1739.
- Pullman, G. S., DeVay, J. E., Garber, R. H., Weinhold, A. R., 1981. Soil solarization: effects on verticillium wilt of cotton and soilborne populations of *Verticillium dahliae*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, and *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology*, 71: 954-959.
- Pung, H., 2003. *Brassica* green manure crops appear to improve soil properties. Biofumigation update. No 18:1.
- R Development Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Ramírez-Villapudua J., Munnecke D. E., 1987. Control of cabbage yellows (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) by solar heating of field soils amended with dry cabbage residues. *Plant Dis.*, 71: 217-221.
- Rangkadilok, N., Nicolas, M. E., Bennett, R. N., Premier, R. R., Eagling, D. R., Taylor, P. W. J., 2002. Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Sci. Horticult.*, 96: 11-26.
- Rasche, F., Hödl, V., Poll, C., Kandeler, E., Gerzabek, M. H., van Elsas, J. D., Sessitsch, A., 2006. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared to the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 56: 219-235.
- Ríos, P., Obregon, S., de Haro, A., Fernández, P., Sánchez, M. E., 2012. Evaluation of biofumigant plants for control of Quercus root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* in rangeland ecosystems. In: 6<sup>th</sup> Meet. IUFRO Working Party 7.02.09. *Phytophthora in Forest and Natural Ecosystems*. Córdoba, Spain.
- Ristaino, J.B., Thomas, W., 1997. Agriculture, methyl bromide and ozone hole: Can we fill the gaps? *Plant Disease*, 81: 964-977.
- Rioja Molina, A. E., 2002. Apuntes de Fitotecnia General, E.U.I.T.A., Ciudad Real.
- Rodman, J. E., 1978. Glucosinolates, Methods of Analysis some chemosystematic problems. *Phytochem. Bull.*, 11 (1-2): 6-31.
- Rodríguez, M. P., 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zool. Mex (n.s.)*. Número especial 1:53-78.

- Rodríguez-Molina, M. C., 1996. Ensayo de caracterización de suelos agrícolas y forestales de Extremadura tomando como indicadores a *Fusarium* Link y *Pythium* Pringsheim: La representatividad del muestreo. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid. 209 pp.
- Rodríguez-Molina, M. C., Picón-Toro, J., Morales Rodríguez, M. C., Palo Osorio, C., Palo Núñez, E. J., Lacasa, A., 2010a. Efecto de la biofumigación con especies de *Brassica* y temperaturas diarias fluctuantes en la inactivación de clamidosporas de *Phytophthora parasitica*. XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Vitoria, del 27 de septiembre al 1 de octubre de 2010. pp. 392.
- Rodríguez-Molina, M. C., Morales-Rodríguez, M. C., Palo Osorio, C., Palo Nuñez, E., Verdejo Alonso, E., Duarte Maya, M. S., Picón-Toro, J., 2010b. *Phytophthora nicotianae*, the causal agent of root and crown rot (Tristeza disease) of red pepper in La Vera region (Cáceres, Spain). Span. J. Agric. Res., 8(3): 770-774.
- Rodríguez-Molina, M. C., Morales-Rodríguez, M. C., Palo Osorio, C., Osuna, M. D., Iglesias, M. J., García, J. A., 2013. Pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD analysis of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Extremadura. European journal of plant pathology, 136 (3): 639-650.
- Rodríguez-Molina, M. C., Palo, E., Palo, C., Espárrago, G., Verdejo, E., Torres-Vila, L. M., García, J. A., Blanco, I., 2007. First report of Fusarium Wilt of flue-cure tobacco caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* in Spain. Plant Disease, 91 (3): 323.
- Rodríguez-Molina, M. C., Verdejo Alonso, E., García Barrado, J. A., Espárrago Rodilla, G., Morales Rodríguez, M. C., Palo Núñez, E., Palo Osorio, C., Torres-Vila, L. M., 2009. La Fusariosis Vascular del tabaco asociada a nematodos formadores de quistes del complejo *Globodera tabacum* en el Valle del Tiétar: estrategias de control. Bol. San. Veg. Plagas, 35: 103-114.
- Rodríguez-Molina, M. C., Serrano-Pérez, P., Palo, C., 2015. Effect of biofumigation with brassica pellets combined with *Brassicaceae* cover crops and plastic cover on the survival and infectivity of inoculum of *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Pest Manag. Sci., 72, 1295-1301.
- Roquero, C., Porta, J., 1992. Agenda de campo para el estudio del suelo. Universidad Politécnica. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Madrid.
- Ros, M., García, C., Hernández, M. T., Lacasa, A., Fernández, P., Pascual, J. A., 2008. Effects of biosolarization as methylbromide alternative for *Meloidogyne incognita* control on quality of soil underpepper. Biology and Fertility of Soils, 45: 37-44.
- Rosa, E. A. S., Heaney, R. K., Fenwick, G. R., Portas, C. A. M., 1997. Glucosinolates in crop plants. Hort. Rev., 19: 99-215.
- Rosa, E. A. S., Heaney, R. K., Portas, C. A. M., Fenwick, G. R., 1996. Changes in glucosinolate concentrations in *Brassica* crops (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growing seasons. J. Sci. Food Agric., 71: 237-244.
- Rosa, E. A. S., Rodrigues, P. M. F., 1998. The effect of light and temperature on glucosinolate concentration in the leaves and roots of cabbage seedlings. J. Sci. Food Agric., 78: 208-212.
- Rouxel, F., Bouhot, D., 1971. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. IV. Nouvelles mises au point concernant l'analyse sélective et quantitative des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* dans le sol. Annual Review of Phytopathology, 3(2): 171-188.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J. A., 1998. Biofumigation potential of brassicas. II. Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. Plant Soil, 201, 91-101.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J. A., Wong, P. T. W., Desmarchelier, J. M., 1998. Biofumigation potential of brassicas. III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. Plant Soil, 201: 103-112.
- Schertz, D. L., 1985. Field Evaluation of the Effect of Soil Erosion on Crop Productivity. Purdue, USA. 22p. These Ph D. Purdue University.
- Schutter, M. E., Sandeno, J. M., Dick, R. P., 2001. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. Biology and Fertility of Soils, 34: 397-410.
- Sellam, A., Lacomis-Vasilescu, B., Hudhomme, P., Simoneau, P., 2007. In vitro antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. Plant Pathol., 56: 296-301.

- Sempere, F., Santamarina, M. P., 2008. Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom. International Journal of Food Microbiology, 122 (1-2): 35-43.
- Serrano-Pérez, P., Palo, C., Rodríguez-Molina, M. C., 2017. Efficacy of *Brassica carinata* pellets to inhibit mycelial growth and chlamydospores germination of *Phytophthora nicotianae* at different temperature regimes. Scientia Horticulturae, 216: 126-133.
- Shaban, W.I., El-Barougy, E., and Zian, A.H. 2011. Control of lupine Fusarium wilt by biofumigation with mustard and canola seed meal. Tunisian Journal of Plant Protection 6: 87-98.
- Shetty, K. G., Subbarao, K. V., Huisman, O. C., Hubbard, J. C., 2000. Mechanism of broccoli mediated *Verticillium* wilt reduction in cauliflower. Phytopathology, 90: 305-310.
- Silva, V. R. da, Reichert, J. M., Reinert, D. J., Bortoluzzi, E. C., 2009. Soil water dynamics related to the degree of compaction of two brazilian oxisols under no-tillage. Revista Brasileira de Ciencia do Solo, 33(5): 1097-1104.
- Silva, W. M. da, Bianchini, A., Cunha, C. A. da, 2016. Modeling and correction of soil penetration resistance for variations in soil moisture and soil bulk density. Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering, 36 (3): 449-459.
- Silva, A. P., Tormena, C. A., Fidalski, J., Imhoff, S., 2008. Funções de pedotransferência para as curvas de retenção de água e de resistência do solo à penetração. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, 32: 1-10.
- Singh, A., Islam, M. N., 2010. In vitro evaluation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora nicotianae*. Int. J. Expt. Agric. 1(1): 20-25.
- Singh, S., Pandey, A., Chaurasia, B., Palni, L. M. S., 2008. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of tea growing in "natural" and "cultivated" ecosystems. Biol. Fertil. Soils, 44: 2099-2103.
- Slusher, R. L., Haas, D. L., Carother, Z. B., Sinclair, J. B., 1974. Ultrastructure at the host-parasite interface of *Phytophthora megaesperma* var. *sojae* in soybean rootlets. Phytopathology, 64: 834-840.
- Smith, B. J., Kirkegaard, J. A., 2002. In vitro inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. Plant Pathol., 51: 585-593.
- Smith, W. H. M., Griffiths, D. W., 1988. A time-course study of glucosinolates in the ontogeny of forage rape (*Brassica napus* L.). J. Sci. Food Agric., 43: 121-134.
- Smith, T. E., Shaw, K. J., 1943. Pathogenicity studies with *Fusaria* isolated from tobacco, sweet potato and cotton. Phytopathology, 33: 469-483.
- Smolinska, U., Horbowicz, M., 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. J. Phytopathol., 147: 119-124.
- Smolinska, U., Knudsen, G. R., Morra, M. J., Borek, V., 1997. Inhibition of *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi* by volatiles produced by hydrolysis of *Brassica napus* seed meal. Plant Dis., 81: 288-292.
- Smolinska U., Kowalczyk, W., 2014. The impact of the *Brassicaceae* plant materials added to the soil on the population of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. and *Fusarium oxysporum* Schlecht. Journal of Horticultural Research, 22: 123-129.
- Smolinska, U., Morra, M. J., Knudsen, G. R., James, R. L., 2003. Isothiocyanates produced by *Brassicaceae* species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. Plant Dis., 87: 407-412.
- Snyder, C. S., Bruulsema, T. W., Jensen, T. L., Fixen, P. E., 2009. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. Agriculture, Ecosystems and Environment, 133: 247-266.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J., 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co. New York. 887 pp.
- Souza, N. L., 1994. Solarização do solo. Summa Phytopathologica, 20: 3-15.
- Sørensen, J. C., 2001. Biorefined oilseed products – high quality products with added value. PhD Thesis. Chemistry Department, KVL, Denmark.
- Srivastava, D., Kapoor, R., Srivastava, S., K., Mukerji, K., G., 1996. Vesicular arbuscular mycorrhiza—an overview. In: Mukerji, K.G. (Ed.), Concepts in Mycorrhizal Research. Kluwer Academic Publishing, Netherlands, pp. 1 –39.



- Stack, J. P., Millar, R. L., 1985. Relative survival potential of propagules of *Phytophthora megalospora* f. sp. *medicaginis*. *Phytopathology*, 75: 1398-1404.
- Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., Hall, G. S., 1990. Revised tabular key to species of *Phytophthora*. *Mycol. Papers*, 162: 1-28.
- Stapleton, J. J., Devay, J. E., 1982. Effect of soil solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings. *Phytopathology*, 72: 323-326.
- Stelluti, M., Maiorana, M. and De Giorgio, D., 1998. Multivariate approach to evaluate the penetrometer resistance in different tillage systems. *Soil and Tillage Research* 3-4: 145-151.
- Stirling, G. R., 1991. *Biological Control of Plant Parasitic Nematode: Progress, Problems and Prospects*. Wallington, UK.
- Stolte, J., Tesfai, M., Øygarden, L., Kværnø, S., Keizer, J., Verheijen, F., Panagos, P., Cristiano Ballabio, C., Hessel, R., 2016. Soil threats in Europe. EUR 27607 EN. doi:10.2788/828742.
- Stone, J. K., Hansen, E. M., 1993. Green manure effects on soilborne pathogens. *Proceedings: Northeastern and Intermountain Forest and Conservation Nursery Associations*. St. Louis, Missouri. pp 57-64.
- Subba Rao N.S., 1999. Organic matter decomposition. In: N. S. Subba Rao. (4th ed.) *Soil microbiology*, Science Publishers, USA, 320 pp.
- Sutton, C. B., 1980. *The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with pycnidia acervuli and stroma*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. UK., 696 pp.
- Tallapragada, P., Gudimi, M., 2011. Phosphate solubility and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Turk. J. Biol.*, 35: 593-600.
- Taylor, H. M., Burnett, E., 1964. Influence of soil strength on the root growth habit of plants. *Soil Sci.*, 98: 174-180.
- Tejada, M., González, J. L., García-Martínez, A. M., Parrado, J., 2008. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Bioresource Technology*, 99: 1758-1767.
- Tello J.C., 1988. La competición microbiana en el suelo. *Horticultura*, 39: 65-83.
- Tello, J. C., 1984. Enfermedades criptogámicas en hortalizas: observaciones en el litoral mediterráneo español. *Comunicaciones INIA, Serie Prot. Veg.* 22, 342 pp.
- Tello-Marquina, J. C., Alabouvette, C., 1984. Observations sur la persistance dans le sol des microconidies de *Fusarium oxysporum*. *Agronomie*, 4 (9): 885-890.
- Tello-Marquina, J. C., Alabouvette, C., Louvet, J., 1980. Aptitude à la conservation des microconidies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Ann. Phytopathol.*, 12 (3): 227-233.
- Tello, J. C., Camacho, F., 2010. Organismos para el control de hongos patógenos en los cultivos protegidos. Fundación Cajamar. El Ejido, Almería, 522 pp.
- Tello, J. C., García, M., 1977. Prospección de enfermedades micológicas en plantas hortícolas (tomate, pimiento, melón, sandía y judía). *Publicación de la 7ª División Agraria*, 28 pp.
- Tello, J. C., Lacasa, A., 1990. *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitaria (fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. *Bol. Inf. Téc. Econ. Agrar.*, 88 (2): 77-94.
- Tello, J., Lacasa, A., 2004. Las enfermedades de origen edáfico y su control en los pimentonales del Campo de Cartagena: una interpretación retrospectiva del sexenio 1979-1985. *Phytoma*, 157: 17-26.
- Tello, J. C., Palmero, D., de Cara, M., Moreno, A., Santos, M., 2011. El suelo como "ente vivo" y su relación con las enfermedades de las plantas. En: Meco, R., Lacasa C., Moreno, M.M. (coords.) *Agricultura Ecológica en Secano. Soluciones sostenibles en ambientes mediterráneos*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, SEAE, Ediciones Mundi-Prensa.
- Tello, J. C., Palmero, D., García, A., de Cara, M., 2010. Biodesinfección del suelo para el control de micosis de origen edáfico, corrección de la "fatiga" y efecto sobre las propiedades físicoquímicas del suelo. En: *Organismos para el control de patógenos en los cultivos protegidos. Prácticas culturales para una agricultura sostenible*. Coord: J.C. Tello y F. Camacho. Fundación Cajamar.

- Tello, J. C., Vares, F., Lacasa, A., 1991. Manual de Laboratorio. Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nematodos Fitopatógenos. MAPA, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Madrid, 484 pp.
- Thangstad, O. P., Evjen, K., Bones, A., 1991. Immunogold-EM localization of myrosinase in *Brassicaceae*. *Protoplasma*, 161: 85-93.
- Tian, D., Babadoost, M., 2004. Host range of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pathogenicity of the isolates. *Plant Dis.* 88:485-489.
- Timmer, L. W., Graham, J. H., Zitko, S. E., 1998. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*: occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. *Plant Dis.*, 82: 254-261.
- Timonen, S., Finlay, R. D., Olsson, S., Soderstrom, B., 1996. Dynamics of phosphorous translocation in intact ectomycorrhizal systems: non-destructive monitoring using a B-scanner. *FEMS Microbiology Ecology*, 19: 171-180.
- Tortosa, J. M., 2009. El futuro del maldesarrollo. *Revista Obets*, 4: 67-83.
- Tjamos, S. E., Markakis, E. A., Antoniou, P., Paplomatas, E. J., 2006. First record of *Fusarium* wilt of tobacco in Greece imported as seedborne inoculum. *Journal of Phytopathology*, 154: 193-196.
- Tsao, P. H., 1971. Chlamydospore formation in sporangium-free liquid cultures of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology*, 61: 1412-1413.
- Tsao, P. H., Oster, J. J., 1981. Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soils amended with nitrogenous organic substances. *Phytopathology*, 71: 53-59.
- Tuset, J. J., 1977. Contribución al conocimiento del género *Phytophthora* de Bary en España. *Anales INIA. Serie Prot. Veg.*, 7: 11-106.
- Tüzel, Y., Duyar, H., Öztekin, G. B., Gürbüz-Kiliç, O., Anaç, D., Madanlar, N., Yoldas, Z., 2013. Effects of winter green manuring on organic cucumber production in unheated greenhouse conditions. *Turk. J. Agric. For.*, 37: 315-325.
- Usaborisut, P., Ampanmanee, J., 2015. Compaction properties of silty soils in relation to soil texture, moisture content and organic matter. *American J. Agric. Biological Sci.*, 10(4): 178-185.
- United States Department of Agriculture (USDA), 1981. Soil erosion effects on soil productivity: a research perspective. *J. Soil and Water Conservation*, 36 (2): 82-90.
- Van Dam, N. M., Tytgat, T. O. G., Kirkegaard, J. A., 2009. Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochem. Rev.*, 8: 171-186.
- Vaz, C. M. P., Manieri, J. M., De Maria, I. C., Tuller, M., 2011. Modeling and correction of soil penetration resistance for varying soil water content. *Geoderma*, Amsterdam, 166 (1): 92-101.
- Van Veen, J. A., Kuikman, P. J., 1990. Soil structural aspects of decomposition of organic matter by micro-organisms. *Biogeochemistry*, 11(3): 213-233.
- Vaughn, S. F., Berhow, M. A., 2005. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products*, 21: 193-202.
- Vázquez, R. A., 1990. Estudio sobre hongos de suelo de Galicia (Comarca de O Salnes, Pontevedra). Tesis Doct., Univ. de Santiago, Santiago, 250 pp.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Soto-Parra, J. M., Martínez-Escudero, E., 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2):194-205.
- Walker, J. C., Morell, S., Foster, H. H., 1937. Toxicity of mustard oils and related sulphur compounds to certain fungi. *Am. J. Bot.*, 24: 536-541.
- Walkley, A., 1935. An examination of methods for determining organic carbon and nitrogen in soils. *Journal of Agricultural Science*, 25: 598-609.
- Wang, X., Boevink, P., McLellan, H., Armstrong, M., Bukharova, T., Qin, Z., Birch, P. R. J., 2015. A host KH RNA-binding protein is a susceptibility factor targeted by an RXLR effector to promote late blight disease. *Mol Plant*, 8: 1385-1395.

- Wang, L., Cai, K., Chen, Y., Wang, G., 2013. Silicon-mediated tomato resistance against *Ralstonia solanacearum* is associated with modification of soil microbial community structure and activity. *Biol. Trace Element Res.*, 152: 275-283.
- Wang, C. Y., He, N. P., Zhang, J. J., Lv, Y. L., Wang, L., 2015. Long-term grazing exclusion improves the composition and stability of soil organic matter in Inner Mongolian grasslands. *PLoS ONE*, 10, e0128837.
- Wang, Q., Ma, Y., Yang, H., Chang, Z., 2014. Effect of biofumigation and chemical fumigation on soil microbial community structure and control of pepper *Phytophthora* blight. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 507-518.
- Warmington, R., Clarkson, J. P., 2016. *Plant Soil*, 401: 213. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2742-8>.
- Waterhouse, G. M., 1963. Key to the species *Phytophthora* de Bary. *Commonw. Mycol. Inst., Mycol. Papers*, 92: 1-22.
- Wei, F., Passey, T., Xu, X., 2016. Effects of individual and combined use of biofumigation-derived products on the viability of *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil. *Crop Prot.*, 79: 170-176.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardener, B. B., Thomashow, L. S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40 (1): 309-348.
- Whittaker, R. H., 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163(3863):150-160.
- Wood, J. L., 1975. Biochemistry. 56-221 pp. En: *Chemistry and Biochemistry of Thiocyanic acid and its Derivatives*. Ed. A Newman, Academic Press, London.
- Wright, S. F., Upadhyaya, A., 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 198: 97-107.
- Yang, H., Niu, J., Tao, J., Gu, Y., Zhang, C., She, S., Chen, W., Yang, H., Yin, H., 2016. The Impacts of Different Green Manure on Soil Microbial Communities and Crop Health. *Preprints*, 2016090056 (doi: 10.20944/preprints201609.0056.v1).
- Yang, L., Xie, J., Jiang, D., Fu, Y., Li, G., Lin, F., 2008. Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1—potential antibiotics against plant pathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 909-915.
- Yao, H., He, Z., Wilson, M. J., Campbell, C. D., 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microbial Ecology*, 40: 223-237.
- YongHong, W., Wei, R., FuGuo, Z., XingMing, Y., YangChung, X., QiRong, S., 2009. Study on conditions in solid-state fermentation of rapeseed meal by mixed strains for amino acid fertilizer. *Scientia Agricultura Sinica*, 42: 3530-3540.
- Yustika, R. D., Muchtar, M., 2016. Soil organic matter status and penetration resistance at alley cropping system on degraded acid dryland. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 4(1): 675-679.
- Zaccardelli, M., De Nicola, F., Vilecco, D., Scotti, R., 2013. The development and suppressive activity of soil microbial communities under compost amendment. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(3): 730-742.
- Zentmyer, G. A., 1961. Chemotaxis of zoospores for root exudates. *Science*, 133: 1595-1596.